

**Endothiapepsin und Proteinkinase A:  
Komplexstrukturen mit neuartigen Inhibitoren,  
Durchmustern einer Fragmentbibliothek sowie  
Inhibitor-design ausgehend von einer Sonde**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von  
**Helene Köster**  
aus Kassel

Marburg/Lahn 2012

Vom Fachbereich Pharmazie der Philipps-Universität Marburg  
als Dissertation angenommen am: 18.07.2012

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerhard Klebe

Zweitgutachter: Dr. Andreas Heine

Tag der mündlichen Prüfung am: 19.07.2012

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Prof. Dr. Gerhard Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit von Januar 2008 bis Juni 2011 durchgeführt.



MEINER TOCHTER

TABEA



# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>XI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign .....	1
1.2 Fragmentbasiertes Wirkstoffdesign .....	4
1.3 Zielsetzung .....	6
<b>2 Aspartylproteasen - Einleitung.....</b>	<b>8</b>
2.1 Die Proteinfamilie im Überblick .....	8
2.2 Vorstellung der Proteine .....	9
2.3 Der katalytische Mechanismus .....	12
2.4 Die Bindetasche .....	14
2.5 Die <i>Flap</i> .....	15
2.6 Inhibitoren .....	17
<b>3 Aspartylproteasen – Ergebnisse .....</b>	<b>20</b>
3.1 Inhibitoren basierend auf der Gewalt Reaktion: .....	21
Drei Bindungsmodi geben Aufschluss über die Flexibilität des	
katalytischen Wassers .....	21
3.1.1 Einleitung .....	21
3.1.2 Affinitätsbestimmungen .....	23
3.1.3 Bestimmung der Kristallstrukturen .....	29
Der Komplex von Endothiapepsin mit RB91 .....	29
Der Komplex von Endothiapepsin mit RB49 .....	31
Der Komplex von Endothiapepsin mit SH40 .....	33
3.1.4 Diskussion.....	36
Ursachen für die verschiedenen Bindemodi.....	36
Die weiteren Inhibitoren dieser Serie.....	38
Endothiapepsin als Modell für die Plasmepsine .....	38
Vergleich mit der anfänglichen Dockinglösung.....	39
Die Flexibilität des katalytischen Wassers .....	40
3.1.5 Zusammenfassung .....	42
3.1.6 Anhang - Affinitäten gegen Pepsin .....	43
3.2 Inhibitoren basierend auf einem Azepin-Grundgerüst: .....	46
Mehrere Moleküle besetzen nahezu die gesamte Bindetasche .....	46
3.2.1 Einleitung .....	46
3.2.2 Affinitätsbestimmungen .....	48

3.2.3	Bestimmung der Kristallstruktur .....	50
	Endothiapepsin im Komplex mit NC239 .....	51
3.2.4	Diskussion.....	54
	Der Bindemodus von NC239 .....	55
	Die weiteren Inhibitoren mit einem Azepin-Grundgerüst.....	57
	Die zusätzlichen Moleküle in der Bindetasche .....	57
3.2.5	Zusammenfassung .....	58
3.3	Inhibitoren basierend auf einem Pyrrolidin Grundgerüst:.....	60
	Die offene <i>Flap</i> von Endothiapepsin sowie Einblicke in die Protonierung der katalytischen Diade .....	60
3.3.1	Einleitung .....	60
3.3.2	Affinitätsbestimmungen .....	61
3.3.3	Bestimmung der Kristallstruktur .....	63
3.3.4	ITC Messungen .....	66
3.3.5	Diskussion.....	70
	Die offene Flap .....	70
	Der Bindemodus von ST47 .....	72
	Die Protonierung der katalytischen Diade .....	74
3.3.6	Zusammenfassung .....	74
3.4	Ritonavir und Saquinavir: .....	76
	Der Bindemodus klassischer HIV-Protease Inhibitoren mit den Pepsin- ähnlichen Aspartylproteasen .....	76
3.4.1	Einleitung .....	76
3.4.2	Bestimmung der Kristallstrukturen .....	77
	Endothiapepsin im Komplex mit Ritonavir .....	78
	SAP2 im Komplex mit Ritonavir.....	80
	Endothiapepsin im Komplex mit Saquinavir .....	81
3.4.3	Diskussion.....	83
	Vergleich der beiden Ritonavir-Strukturen.....	83
	Vergleich mit den Bindemodi in der HIV-Protease .....	85
3.4.4	Zusammenfassung .....	87
3.5	Benzamidin und Inhibitoren mit einer zentralen Hydrazidfunktion.....	88
	Einstieg in das fragmentbasierte Wirkstoffdesign .....	88
3.5.1	Einleitung .....	88
3.5.2	Bestimmung der Komplexstrukturen mit Endothiapepsin .....	90
	Endothiapepsin im Komplex mit SB217.....	90
	Endothiapepsin im Komplex mit Benzamidin .....	91
3.5.3	Bestimmung der Benzamidin-SAP2 Komplexstruktur .....	93
3.5.4	Diskussion.....	95
	Die Komplexstruktur von SB217 .....	95



	Die beiden Benzamidin-Strukturen .....	96
3.5.5	Zusammenfassung .....	98
3.6	Untersuchung einer nicht auf der Dreierregel basierten Fragmentbibliothek mit Endothiapepsin .....	100
3.6.1	Einleitung .....	100
3.6.2	Design der Bibliothek .....	101
3.6.3	Validierung der Bibliothek mit Endothiapepsin .....	104
3.6.4	Analyse der Kristallstrukturen .....	108
3.6.5	Diskussion .....	116
3.6.6	Schlussfolgerung .....	117
<b>4</b>	<b>Proteinkinase A – Einleitung .....</b>	<b>119</b>
4.1	Die Bedeutung der Proteinkinase A .....	119
4.2	Struktur .....	120
4.3	Bindung von ATP und Mechanismus .....	123
4.4	Inhibitoren .....	124
<b>5</b>	<b>Proteinkinase A – Ergebnisse .....</b>	<b>125</b>
5.1	Phenol als Startpunkt für ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign .....	126
	Von einer Sonde zu einem affinen Liganden .....	126
5.1.1	Einleitung .....	126
5.1.2	Die PKA-Phenol Komplexstruktur als Startpunkt .....	127
5.1.3	Von Phenol zu einem Fragment .....	129
5.1.4	Expansion zu einer Leitstruktur .....	131
5.1.5	Ausbau der ersten Leitstrukturen .....	136
5.1.6	Einführung eines Abstandshalters .....	139
5.1.7	Zusammenfassung .....	146
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung (deutsch und englisch) .....</b>	<b>148</b>
<b>7</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>152</b>
7.1	Proteingewinnung .....	152
7.2	Kristallisation .....	154
7.2.1.	Endothiapepsin .....	154
7.2.2	PKA .....	157
7.2.3	SAP2 .....	159
7.3	Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung .....	160
7.4	Affinitätsbestimmungen .....	163
7.4.1	Fluoreszenzbasierter Assay für Endothiapepsin .....	163
7.4.2	SPR Messungen an PKA .....	166
7.4.3	ITC Messungen an Endothiapepsin .....	168
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>172</b>

<b>9</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>185</b>
	Liste weiterer im Screen gefundener Kristallisationsbedingung für EP .....	185
	Liste der Screening-Ergebnisse für die gesamte Fragmentbibliothek .....	186
	Liste aller Kristallstrukturen .....	189
	Veröffentlichungen .....	192
	<b>Danksagung.....</b>	<b>193</b>
	<b>Erklärung .....</b>	<b>197</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>199</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AKAP	A Kinase ankerndes Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BESSY	Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung (Synchrotron in Berlin)
bzw.	beziehungsweise
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CSD	Cambridge Structural Database (Kleinmoleküldatenbank)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: desoxyribonucleic acid)
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
engl.	englisch
EP	Endothiapepsin
F <sub>c</sub>	berechneter Strukturfaktor
F <sub>o</sub>	beobachteter Strukturfaktor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HTS	Hochdurchsatzscreening (engl.: high throughput screening)
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie (engl.: isothermal titration calorimetry)
MES	Morpholinoethansulfonsäure
MPD	2-methyl-2,4-pentandiol
NMR	Kernspinresonanzspektroskopie (engl.: nuclear magnetic resonance)
PDB	RCSB Protein Databank (Proteindatenbank)
PEG	Polyethylenglycol
PKA	Proteinkinase A (camp abhängige Proteinkinase)
PKI	Proteinkinase A Inhibitor
Plm	Plasmepsin
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
SAP2	Sekretorische Aspartylprotease 2
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: Sodium dodecyl sulfate)
SLS	Swiss Light Source (Synchrotron in Villigen)
SPR	Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (engl.: Surface plasmon resonance spectroscopy)
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

## Abkürzungen der Aminosäuren

Ala	Alanin	Leu	Leucin
Arg	Arginin	Lys	Lysin
Asn	Asparagin	Met	Methionin
Asp	Aspartat	Phe	Phenylalanin
Cys	Cystein	Pro	Prolin
Gln	Glutamin	Ser	Serin
Glu	Glutamat	Thr	Threonin
Gly	Glycin	Trp	Tryptophan
His	Histidin	Tyr	Tyrosin
Ile	Isoleucin	Val	Valin

## Abkürzungen der Einheiten und Größen

°C	Grad Celsius	IC <sub>50</sub>	mittlere inhibitorische Konzentration
μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )	K <sub>a</sub>	Assoziationskonstante
Å	Ångström (10 <sup>-10</sup> m)	K <sub>d</sub>	Dissoziationskonstante
cal	Kalorie (1 cal = 4,1868 J)	K <sub>i</sub>	Inhibitionskonstante
Da	Dalton (entspricht g/mol)	K <sub>m</sub>	Michaelis Konstante
g	Gramm	K <sub>off</sub>	Dissoziationskonstante (SPR)
h	Stunde	K <sub>on</sub>	Assoziationskonstante (SPR)
J	Joule	logP	Oktanol-Wasser Verteilungskoeffizient
l	Liter	R <sub>free</sub>	Freier R-Wert
M	molar (entspricht mol/l)	R <sub>work</sub>	Arbeits R-Wert
m	milli (10 <sup>-3</sup> )	TPSA	gesamte polare Oberfläche (engl.: total polar surface area)
min	Minute	ΔG	Änderung der Gibbs-Energie
mol	Mol	ΔH	Änderung der Entropie
n	nano (10 <sup>-9</sup> )	ΔS	Änderung der Enthalpie
RU	Response Unit		

# 1 Einleitung

## 1.1 Strukturbasiertes Wirkstoffdesign

Die Suche nach neuen Arzneimitteln hat sich im Laufe der letzten Jahrzehnte stark verändert. Die traditionelle Arzneimittelforschung beruht vor allem auf den vielfältigen Stoffen die uns die Natur zu bieten hat. Oft wurde durch Zufall ein wirksamer Extrakt gefunden aus dem anschließend in mühsamer Kleinarbeit das wirksame Prinzip isoliert wurde. War einmal die chemische Struktur bekannt, wurde oft eine Vielzahl von Analoga synthetisiert um das Wirkprofil zu verändern. Ein prominentes Beispiel ist die Entdeckung, Isolierung und spätere Modifizierung von Penicillin.<sup>[1, 2]</sup>

Mit dem Aufkommen neuer Technologien wandelte sich das Vorgehen hin zu einem rationalen Wirkstoffdesign.<sup>[3-8]</sup> Heute ist die strukturbasierte Wirkstoffentwicklung ein Teil der meisten industriellen und universitären Projekte die auf die Entwicklung neuer Arzneimittel ausgerichtet sind. Besonders das bessere Verständnis von physiologischen und pathologischen Vorgängen, die Entschlüsselung des menschlichen Genoms und die Verfügbarkeit von Methoden wie der Röntgenkristallographie haben maßgeblich dazu beigetragen.

Die grundlegende Idee im strukturbasierten Wirkstoffdesign ist es, ein einzelnes Protein (in seltenen Fällen ist die Zielstruktur auch DNA oder RNA) mit einem maßgeschneiderten Liganden auszuschalten und somit den gewünschten therapeutischen Effekt zu erzielen. Der erste Schritt ist dabei die Auswahl eines geeigneten Zielproteins. Dieses sollte eine essentielle Rolle in dem betreffenden Krankheitsbild erfüllen und seine Funktion sollte nicht durch andere Proteine ersetzbar sein. Diese beiden Kriterien führen dazu, dass bei dem Ausschalten des entsprechenden Proteins ein Stoffwechselpfad ausfällt bzw. deutlich abgeschwächt wird was zu der erwünschten Wirkung führt. Nicht zuletzt sollte das Protein eine geeignete Bindestelle für kleine Liganden aufweisen.<sup>[8]</sup> In der Regel sind es Enzyme die für diese Art der Wirkstoffentwicklung geeignete Zielproteine stellen.

Ist ein geeignetes Zielprotein identifiziert worden, beginnt der eigentliche Zyklus des systematischen Finden und Optimieren eines Liganden. In Abbildung 1.1 ist der grobe schematische Ablauf dargestellt. Zuerst wird eine dreidimensionale Raumstruktur des Proteins benötigt. Diese wird meist durch die Röntgenkristallographie erhalten. Andere Methoden sind die NMR-Spektroskopie oder Homologiemodellierung, wobei diese meist eine zumindest ähnliche Kristallstruktur als Grundlage benötigen. Je nach Protein kann die Bestimmung einer initialen Kristallstruktur sehr viel Zeit in Anspruch nehmen, so dass dieser Schritt nicht selten der limitierende ist.

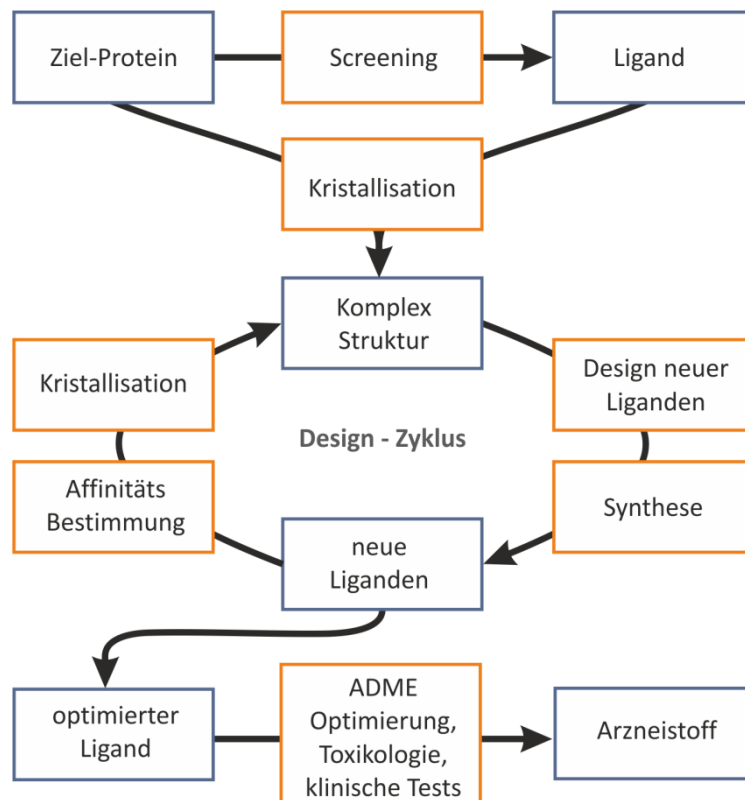


Abbildung 1.1: Graphische Darstellung des strukturbasierten Wirkstoffdesigns

Ist die dreidimensionale Struktur bekannt, beginnt die Suche nach einem geeigneten Liganden. Neben dem rein experimentellen Durchmustern einer Datenbank nach aktiven Substanzen, dem so genannten High-Throughput-Screening, können auch Computermethoden erfolgreich eingesetzt werden. So lässt sich z.B. anhand der Kristallstruktur ein Pharmakophor aus der Bindetasche ableiten. Ein Pharmakophor gibt Auskunft darüber an welchen Stellen der Bindetasche welche Atomtypen bevorzugt werden. Anhand dieses Musters lassen sich neue Liganden finden die diese Muster möglichst gut erfüllen. Oft wird ein iteratives Vorgehen aus experimentellen und computerbasierten Methoden angewandt. Konnte ein aktiver Ligand identifiziert werden, wird eine Kristallstruktur des Protein-Ligand Komplexes aufgenommen. Die genaue Kenntnis des Bindungsmodus bildet die Grundlage für das strukturbasierte Design. Sobald eine Verbindung mit einer ausreichenden Affinität, einer synthetisch gut modifizierbaren Grundstruktur und einem bekannten Bindungsmodus gefunden worden ist, kann diese als Ausgangspunkt für die weitere Entwicklung dienen.

Ist eine Ausgangsverbindung gefunden wird diese schrittweise optimiert mit dem Ziel einen hochaffinen selektiven Inhibitor für das Zielprotein zu erhalten. Anhand der ersten Komplexstruktur werden in der Regel computergestützt Vorschläge für eine Verbesserung des Liganden entworfen. Eine Serie neuer Inhibitoren wird synthetisiert und anschließend auf Aktivität getestet. Von den vielversprechendsten Inhibitoren der

Serie wird wiederum eine Komplexstruktur bestimmt und der Zyklus beginnt von vorne.

Als Resultat aus dem strukturbasierenden Wirkstoffdesign erhält man eine für das Zielprotein hochaffine Verbindung. Für einen Arzneistoff spielen aber noch andere Parameter eine entscheidende Rolle. So folgen auf das strukturbasierte Design noch weitere Optimierungen in Bezug auf die Toxikologie sowie die ADME-Parameter Absorption, Distribution, Metabolisation und Elimination. Dadurch wird sichergestellt, dass der Arzneistoff sein Ziel im Körper erreicht und später wieder ausgeschieden wird. Erst nachdem die so entwickelten Verbindungen sich auch in klinischen Tests bewährt haben können sie als Arzneistoff zugelassen werden. Somit stellt das strukturbasierte Design nur den ersten Schritt auf dem langen Weg zum Arzneistoff dar.

### *Bedeutung der Kristallographie*

Die Kenntnis des Bindemodus ist für das strukturbasierende Wirkstoffdesign von zentraler Bedeutung. Die Röntgenkristallographie ist dabei die mit Abstand meist genutzte Methode um diesen zu erhalten. Die herausragende Bedeutung, welche die Kristallographie in den letzten Jahren erreicht hat, lässt sich erahnen, wenn man sich die Zunahme der in der PDB (RSCB Protein Datenbank) deponierten Strukturen ansieht (Abbildung 1.2).

Der in einer Kristallstruktur vorgefundene Bindemodus wird oft ohne weiteres Hinterfragen als der relevante und einzige angesehen. Dennoch gibt es einige Einschränkungen. Der gesuchte Bindemodus ist in der Regel der Bindemodus der auch in Lösung vorliegt. Die Situation in Lösung ist aber oft nicht direkt mit der in einem Proteinkristall vergleichbar. Während ein Protein in Lösung flexibel ist und eine Vielzahl an Konformationen einnehmen kann, befindet es sich im Kristall hingegen in einer konformativ deutlich eingeschränkten Geometrie, die nicht immer der in Lösung bevorzugten entsprechen muss. Dass verschiedene Kristallpackungen unterschiedliche Bindemodi verursachen können, wurde in der Literatur bereits gezeigt. So konnten Blum et al. den selben HIV-Protease-Ligand Komplex in zwei unterschiedlichen Raumgruppen kristallisieren und fanden zwei verschiedene Bindungsmodi.<sup>[9]</sup> Dass auch die experimentellen Bedingungen einen Einfluss haben können, wurde von Steuber et al. anhand von Aldose-Reduktase-Ligand Komplexen demonstriert.<sup>[10]</sup> Durch unterschiedliche Soaking- und Kokristallisationsprotokolle konnten Veränderungen im Bindemodus beobachtet werden.

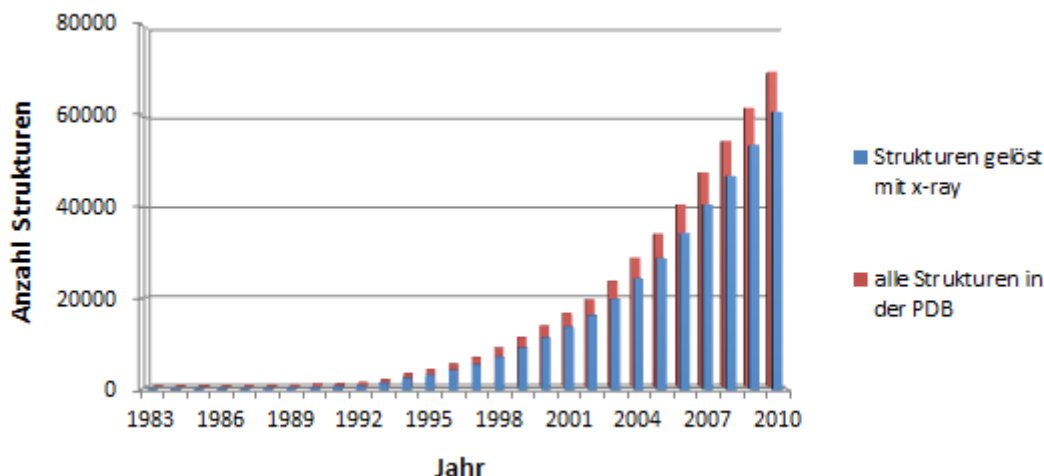


Abbildung 1.2: Entwicklung der in der Proteindatenbank (PDB) deponierten Strukturen<sup>[11]</sup>

Trotz all dieser Einschränkungen sind Kristallstrukturen unverzichtbar um Protein-Ligand Wechselwirkungen zu erforschen und die Vielzahl der erfolgreichen Designprojekte beweist die hohe Relevanz und Zuverlässigkeit der zugrunde liegenden Strukturen. Dennoch sollte stets die Möglichkeit bedacht werden, dass noch weitere Bindungsmodi als der kristallographisch bestimmte vorliegen können.

## 1.2 Fragmentbasiertes Wirkstoffdesign

Fragmentbasiertes Wirkstoffdesign stellt eine Sonderform des strukturbasierten Designs dar. Während das klassische Wirkstoffdesign von Verbindungen ausgeht die oft schon ein Arzneistoff-typisches Molekulargewicht von um die 350-500 g/mol aufweisen, setzt das fragmentbasierte Design auf deutlich kleinere Moleküle im Bereich bis zu 300 g/mol.<sup>[12, 13]</sup> Der Vorteil der Fragmente liegt in ihrer geringen Größe. Dadurch können sie leicht, ohne das für Arzneistoffe angepeilte Molekulargewicht zu überschreiten, zu einem hochaffinen Inhibitor optimiert werden. Zudem kann mit kleinen Molekülen bereits mit einer geringen Anzahl an Verbindungen ein großer chemischer Bereich abgedeckt werden, wodurch sich die zu testenden Substanzbibliotheken deutlich verkleinern.<sup>[14, 15]</sup>

In aller Regel besitzt ein kleineres Molekül aufgrund seiner geringeren Anzahl an Wechselwirkungen mit dem Zielprotein eine im Vergleich zu größeren Inhibitoren verminderte Affinität. Um das Verhältnis von Affinität zu Ligandgröße besser einzuschätzen wurde in diesem Zusammenhang die Ligand-Effizienz eingeführt.<sup>[16]</sup> Für einen optimalen, d.h. effizienten, Inhibitor wird demnach nicht nur eine hohe Potenz, sondern auch ein möglichst kleines Molekulargewicht gefordert. Die niedrige Affinität



der Fragmente ist aber, vom experimentellen Standpunkt aus, ihr größter Nachteil. So ist ihre Bindung in den verschiedenen Assays oft nur schwer nachzuweisen und auch die erfolgreiche Kristallisation mit einem Protein gestaltet sich oft schwierig. So konnte sich erst durch die Verfügbarkeit von neuen, sehr empfindlichen Messverfahren für Protein-Ligand Wechselwirkungen das fragmentbasierte Wirkstoffdesign als gängige Methode etablieren. Insbesondere die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) und Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (SPR) sind häufig angewandte, sensitive Methoden um niedrig affine Liganden aufzuspüren. Neben dem üblichen Ansatz eine Bibliothek mit Hilfe eines Assays vorzufiltern und nur die gefundenen Treffer kristallographisch zu untersuchen, ermöglicht die in der Regel verhältnismäßig kleine Bibliotheksgröße auch sämtliche Fragmente kristallographisch zu testen.<sup>[17]</sup> Das Interesse an dem fragmentbasierten Design zeigt sich neben der vielfältigen Literatur zu diesem Thema <sup>[18-25]</sup> auch in der Vielzahl der erfolgreichen Projekte. So wurden unter anderem für mehrere Kinasen<sup>[26-29]</sup> und Phosphatasen<sup>[30, 31]</sup>, einer Aspartylprotease (BACE)<sup>[32, 33]</sup>, einem Chaperon (HSP90)<sup>[34, 35]</sup> sowie der DNA Gyrase<sup>[36, 37]</sup> ausgehend von Fragmenten hochaffine Liganden synthetisiert.

### 1.3 Zielsetzung

Der Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der kristallographischen Aufklärung der Bindungsmodi unterschiedlicher Liganden.

Die Arbeit gliedert sich dabei grob in die Projekte um die pepsinähnlichen Aspartylproteasen sowie der Proteinkinase A.

Die Familie der pepsinähnlichen Aspartylproteasen beinhaltet eine Vielzahl an Proteinen welche, in schwerwiegenden Erkrankungen, wie z.B. Malaria (Plasmepsine), Alzheimer ( $\beta$ -Sekretase) oder Bluthochdruck (Renin) involviert sind. Somit sind die Vertreter dieser Proteinfamilie interessante Zielproteine für die Wirkstoffentwicklung. Im Vorfeld dieser Arbeit wurden vielfältige Aspartylprotease-Inhibitoren, insbesondere für Plasmepsin, synthetisiert. Da es nicht gelang eine Komplexstruktur mit Plasmepsin zu erhalten, wurde beschlossen eine alternative pepsinähnliche Aspartylprotease als Modellprotein zu verwenden. An diesem Punkt setzt die vorliegende Arbeit an. Das vorrangige Ziel bestand darin, mittels eines geeigneten Modellproteins die Bindungsmodi dieser Liganden zu bestimmen. Nachdem sich das ursprünglich gewählte Modellprotein (Pepsin vom Schwein) aufgrund seiner schlechten Kristallisationseigenschaften als nicht geeignet herausstellte, wurde Endothiapepsin, ein in der Literatur oft verwendetes Modellsystem, als Alternative gewählt. Für dieses Protein wurde in unserem Labor die Kristallisation etabliert sowie, angelehnt an den HIV-Protease-Assay, ein fluoreszenzbasierter Assay zur Affinitätsbestimmung entwickelt. Zusätzlich wurde auch die Kristallisation der sekretorischen Aspartylprotease 2 (SAP2), einem weiteren Mitglied der pepsinähnlichen Aspartylproteasen, aufgebaut. Die so etablierten Protokolle boten eine verlässliche Grundlage um den Bindungsmodus verschiedenster Inhibitoren kristallographisch zu untersuchen. Darüber hinaus wurde Endothiapepsin genutzt, um eine hausinterne Fragmentbibliothek zu validieren. Dazu wurden die Assay- und Kristallisationsbedingungen an die speziellen Anforderungen der niedrig affinen Fragmente angepasst.

Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Proteinkinase A (PKA). Das Ziel dieses Projekts liegt in der exemplarischen Optimierung eines kleinen Sondenmoleküls zu einem hochaffinen Liganden. Die Aufgabe in diesem Kooperationsprojekt bestand darin, die initiale Komplexstruktur einer Sonde zu bestimmen sowie anschließend die Verbindungen der nachfolgenden Zyklen kristallographisch zu untersuchen und so deren exakten Bindemodus zu ermitteln. Dazu wurde ein entsprechendes Kristallisationsprotokoll von unseren Kooperationspartnern übernommen und in unserem Labor etabliert.

*Vorbemerkung zu den Bildern:*

Die Bilder welche die verschiedenen Komplexstrukturen zeigen wurden mit dem Programm Pymol<sup>[38]</sup> erzeugt. Soweit nicht anders angegeben wird dabei folgende Farbgebung verwendet: Sauerstoffatome sind rot dargestellt, Stickstoffatome blau, Protein-Kohlenstoffatome weiß und Ligand-Kohlenstoffatome lachsfarben. Die dargestellten Oberflächen wurden mit der Standardeinstellung erzeugt, welche der Connolly-Oberfläche bei einem Sondenradius von 1.4 Å entspricht.

## 2 Aspartylproteasen - Einleitung

### 2.1 Die Proteinfamilie im Überblick

Aspartylproteasen sind eine weitverbreitete Klasse von Enzymen. Sie kommen in Tieren, Pflanzen, Pilzen und Viren gleichermaßen vor. Als Protease besteht ihre Funktion in der hydrolytischen Spaltung von Peptiden, wobei hier die Bandbreite von auf spezielle Peptide spezialisierte Enzyme (z.B. Renin) bis hin zu Verdauungsenzymen, welche fast jedes Protein angreifen (z.B. Pepsin), reicht. Daneben zeichnen sie sich (mit einigen Ausnahmen) durch ein Optimum im sauren bis neutralen pH-Bereich und die Inhibition durch Pepstatin aus. Pepstatin, ein Hexapeptid welches erstmals aus *Streptomyces* Arten gewonnen wurde, enthält die ungewöhnliche Aminosäure Statin. Sie ist auch ein zentraler Baustein vieler kommerziell angebotener Aspartylprotease-Inhibitoren.

Die Familie der Aspartylproteasen unterteilt sich in eine Vielzahl von Unterfamilien. Die größten und wichtigsten Klassen sind hierbei A1 (pepsinähnliche Aspartylproteasen) und A2 (retrovirale Aspartylproteasen).

Familie	Prototyp	Mitglieder	mit PDB Eintrag
<b>A1</b>	pepsin A( <i>Homo sapiens</i> )	144	33
<b>A2</b>	HIV-1 retropepsin('human immunodeficiency virus 1')	52	6
<b>A3</b>	cauliflower mosaic virus-type peptidase('cauliflower mosaic virus')	6	0
<b>A5</b>	thermopsin( <i>Sulfolobus acidocaldarius</i> )	1	0
<b>A6</b>	nodavirus peptidase('flock house virus')	1	1
<b>A8</b>	signal peptidase II( <i>Escherichia coli</i> )	1	0
<b>A9</b>	spumapepsin('human spumaretrovirus')	1	1
<b>A11</b>	Copia transposon peptidase( <i>Drosophila melanogaster</i> )	6	0
<b>A21</b>	tetravirus peptidase('Nudaurelia capensis omega virus')	1	1
<b>A22</b>	presenilin 1( <i>Homo sapiens</i> )	21	0
<b>A24</b>	type 4 prepilin peptidase 1( <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	5	0
<b>A25</b>	gpr peptidase( <i>Bacillus megaterium</i> )	1	1
<b>A26</b>	omptin( <i>Escherichia coli</i> )	5	1
<b>A31</b>	HybD peptidase( <i>Escherichia coli</i> )	5	1
<b>A33</b>	skin aspartic protease( <i>Mus musculus</i> )	1	1

Quelle: MEROPS Datenbank Stand 08/2010

Abbildung 2.1: Überblick über die Familien der Aspartylproteasen. Zu jeder Familie ist das als Prototyp geltende Enzym, dessen Ursprungsorganismus (in Klammern), die Anzahl der bekannten Mitglieder diese Familie sowie die Anzahl der Mitglieder von denen mindestens eine Struktur in der Proteindatenbank hinterlegt ist angegeben.

Die retroviralen Aspartylproteasen bestehen aus zwei identischen Untereinheiten. Jede dieser Untereinheiten steuert ein Aspartat zu der katalytischen Diade bei. Ein prominentes Beispiel aus dieser Familie ist die HIV-Protease.

Pepsinähnliche Aspartylproteasen bestehen hingegen aus nur einer einzigen Kette. Trotzdem lassen sich zwei, evolutionär durch Genduplikation entstandene, Domänen ausmachen, die sich in vielen Aspekten gleichen und jeweils eins der beiden katalytischen Aspartate beitragen. Alle pepsinähnlichen Aspartylproteasen teilen die für diese Familie A1 typische saure Protease-Faltung, eine fassartige (englisch: „barrel“) Faltung, welche in die Oberkategorie der nur- $\beta$ -Proteine gehört. Die Enzyme werden in der Regel als selbstinhibierende Propeptide synthetisiert und aktivieren sich im sauren Medium durch die autokatalytische Abspaltung des N-Terminus. Zu den bekanntesten Vertretern dieser Familie gehören Pepsin, Endothiapepsin, Cathepsin D,  $\beta$ -Secretase, Renin, die Plasmepsine sowie die sekretorischen Aspartylproteasen.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf den pepsinähnlichen Aspartylproteasen, welche im Folgenden genauer vorgestellt werden.

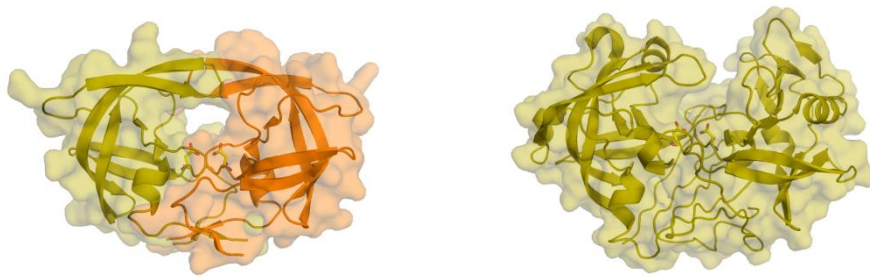


Abbildung 2.2: Die Faltung der HIV Protease (links) und Endothiapepsin (rechts) im Vergleich. Beide Proteine sind in der *Cartoon*-Repräsentation umgeben von Ihrer Oberfläche dargestellt. Zur besseren Orientierung sind zusätzlich die katalytischen Aspartate gezeigt. Im Falle der HIV-Protease sind beide Monomere verschieden eingefärbt. Zur Darstellung wurden die Strukturen mit dem PDB-Code 2B60 sowie 1OEW (ohne die jeweiligen Liganden) verwendet.<sup>[39, 40]</sup>

## 2.2 Vorstellung der Proteine

Neben den beiden in dieser Arbeit verwendeten Proteinen, Endothiapepsin und SAP2, sollen hier mit den Plasmepsinen, Renin und der  $\beta$ -Sekretase auch kurz die wichtigsten Zielproteine unter den pepsinähnlichen Aspartylproteasen vorgestellt werden.

### *Endothiapepsin*

Endothiapepsin wird von dem Pilz *Cryphonectria parasitica* (Synonyme: Chesnut blight fungus und *Endothia parasitica*) synthetisiert und in seine Umgebung sezerniert. Dieser

Pilz ist der Auslöser des so genannten Kastanienrindenkrebs welcher in Nordamerika die amerikanische Kastanie so gut wie ausgerottet hat.<sup>[41]</sup> Für den Menschen ist der Pilz ungefährlich. Endothiapepsin wird kommerziell aufgrund seiner milchgerinnenden Eigenschaft als Labersatz in der Käseherstellung verwendet.<sup>[42, 43]</sup> Das 330 Aminosäuren umfassende Protein mit einem für diese Proteinfamilie typischen pH-Optimum bei pH 4.5 ist ein oft verwendetes Modellsystem für die pepsinähnlichen Aspartylproteasen.<sup>[44]</sup> So wurde eine Vielzahl an allgemeinen Studien zu dem katalytischen Mechanismus an Endothiapepsin durchgeführt.<sup>[45-47]</sup> Zudem diente es in der Wirkstoffentwicklung bereits erfolgreich als Modellprotein für die  $\beta$ -Sekretase<sup>[48]</sup> sowie Renin.<sup>[49]</sup>

### *Sekretorische Aspartylproteasen*

Die Sekretorischen Aspartylproteasen (Synonym: Candidapepsine) werden von dem Pilz *Candida albicans* exprimiert. *Candida albicans* ist der häufigste Erreger der Candidose. Während etwa 70 % der gesunden Bevölkerung meist ohne Beschwerden mit diesem Pilz infiziert sind, ist die systemische Infektion eine lebensbedrohliche Komplikation bei immunsupprimierten Personen (z.B. AIDS Patienten).<sup>[50]</sup> *Candida albicans* besiedelt bevorzugt die Schleimhäute im Mund, Rachen und Vaginalbereich sowie den Verdauungstrakt. Der polymorphe Pilz ändert dabei je nach Umgebungsbedingungen seine Erscheinungsform und damit auch Pathogenität.<sup>[51]</sup>

*Candida albicans* exprimiert mindestens 10 verschiedene Aspartylproteasen (sekretorische Aspartylproteasen, abgekürzt SAP). Dabei werden SAP1-SAP8 sekretiert wohingegen SAP9 und SAP10 membrangebunden innerhalb der Zelle vorliegen.<sup>[52]</sup> Die Expression der sekretorischen Aspartylproteasen ist dabei fein gesteuert und variiert je nach vorliegenden Phänotyp des Pilzes.<sup>[51]</sup> Die am stärksten exprimierte und aus diesem Grund bestuntersuchte dieser Aspartylproteasen ist die SAP2 welche auch in dieser Arbeit verwendet wurde. Die Rolle der einzelnen SAP-Isoenzyme ist noch nicht im Detail verstanden. Die SAP2 weist eine breite Substratspezifität auf und ihr scheint durch die Hydrolyse verschiedener Proteine eine entscheidende Bedeutung bei der Bereitstellung von Stickstoff für das Wachstum des Pilzes zuzukommen. Zudem hilft sie dem Pilz durch Schädigung des umgebenden Gewebes dieses zu penetrieren und zu kolonisieren.<sup>[53]</sup> Die SAP2 weist in ihrer aktiven Form 342 Aminosäuren auf und gehört mit bislang lediglich zwei Strukturen in der Proteindatenbank zu den kristallographisch weniger gut untersuchten pepsinähnlichen Aspartylproteasen.

Trotz vieler Hinweise, dass eine Inhibition der sekretorischen Aspartylproteasen *Candida albicans* wirksam bekämpft, stellen einzelne neuere Studien die Bedeutung dieser Enzyme bei der Invasion von menschlichen Epithelzellen in Frage. Ob die Sekretorischen Aspartylproteasen damit als potentielle Zielproteine für ein

Wirkstoffdesign geeignet sind, ist damit zum jetzigen Zeitpunkt nicht endgültig entscheidbar und muss sich erst in weiteren Untersuchungen zeigen.<sup>[52, 54, 55]</sup>

### *Plasmepsine*

Plasmepsine spielen eine wichtige Rolle im Stoffwechsel aller Plasmodium Arten, dem Erreger der Malaria. Die meisten der tödlich verlaufenden Infektionen sind dabei auf *Plasmodium falciparum* zurückzuführen. Der Parasit durchläuft einen komplexen Lebenszyklus mit der Anopheles Mücke als Endwirt und dem Menschen als Zwischenwirt. Im menschlichen Körper befallen Plasmodien, nach der initialen Leberphase, Erythrozyten und bauen das dort befindliche Hämoglobin ab. Für eine detaillierte Beschreibung des Lebenszyklus sei hier auf die Literatur verwiesen.<sup>[56]</sup> Die initiale Spaltung des Hämoglobins wird durch das Zusammenspiel von Plasmepsinen (pepsinähnliche Aspartylproteasen) sowie Falcipainen (Cysteinproteasen) bewerkstelligt. Eine Hemmung der Plasmepsine stört den Hämoglobinabbau und beeinträchtigt damit das Wachstum des Parasiten maßgeblich.<sup>[57-59]</sup> Somit könnten Plasmepsin-Inhibitoren erfolgreich gegen Malaria eingesetzt werden. In *Plasmodium falciparum* werden mindestens 10 verschiedene Plasmepsin-Isoformen exprimiert welche mit Plasmepsin I bis Plasmepsin X durchnummeriert sind. Auch die Histidin-Aspartylprotease (HAP, dort ist eins der katalytischen Aspartate durch ein Histidin ersetzt) ist am Hämoglobinabbau beteiligt und gehört zu den Plasmepsinen im weiteren Sinne.<sup>[60]</sup> Die exakte Rolle der einzelnen Plasmepsine ist noch nicht bekannt. Plasmepsin I, II und IV gehören neben der HAP zu den bestuntersuchten Plasmepsinen.

### *Renin*

Renin ist im menschlichen Körper maßgeblich an der Blutdruckregulation beteiligt. Renin, welches in der Niere gebildet wird, spaltet Angiotensinogen und setzt somit dessen aktive Form, das Angiotensin I, frei. Dieses wird anschließend von ACE (Angiotensin-Converting-Enzyme) in Angiotensin II gespalten, welches stark gefäßverengend und damit blutdrucksteigernd wirkt. Zudem fördert Angiotensin II die Ausschüttung von Aldosteron und Vasopressin (synonym: ADH). Diese Kaskade wird auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System genannt und ist ein häufiger Angriffspunkt für eine blutdrucksenkende Therapie. So sind ACE-Hemmer, AT<sub>1</sub>-Antagonisten (Angiotension-Rezeptorblocker) und neuerdings auch der Renin-Inhibitor Aliskiren als Arzneimittel zugelassen. Die Entwicklung des Renin-Inhibitors Aliskiren ist ein prominentes Beispiel für ein gelungenes Wirkstoffdesign.<sup>[5]</sup>

### $\beta$ -Sekretase

Die  $\beta$ -Sekretase (beta-Sekretase, Synonyme: BACE1, Memapsin 2) spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Alzheimer Krankheit. Sie ist ein membrangebundenes Protein, welches das Amyloid-Vorläuferprotein (APP) spaltet. Daran anschließend spaltet die  $\gamma$ -Sekretase (ein Proteinkomplex mit einem Presenilin als aktiver Untereinheit) das resultierende Spaltprodukt und setzt  $\beta$ -Amyloid frei. Im Gehirn sowie den Blutgefäßen von Alzheimerpatienten finden sich vermehrt neurotoxische Ablagerungen dieses Peptids welche auch als „senile Plaques“ bekannt sind. In gesunden Patienten wird  $\beta$ -Amyloid ebenfalls gebildet, ohne sich jedoch abzulagern. Neben der  $\beta$ -Secretase wird APP auch durch die  $\alpha$ -Sekretase, einer Metalloprotease, gespalten, allerdings an einer anderen Position. Das durch die Spaltung mittels der  $\alpha$ -Sekretase gebildete Peptid (sAPP) ist im Unterschied zu  $\beta$ -Amyloid wasserlöslich und gilt als neuroprotektiv. Somit ist die Hemmung der  $\beta$ -Sekretase ein vielversprechender Ansatz um den Verlauf einer Alzheimererkrankung positiv zu beeinflussen.<sup>[61]</sup> Das große Interesse an diesem Protein zeigt sich in den vielfältigen Inhibitoren die, insbesondere auch im industriellen Umfeld, bereits für dieses Protein synthetisiert wurden.<sup>[62]</sup>

## 2.3 Der katalytische Mechanismus

Der grundlegende katalytische Mechanismus der pepsinähnlichen Aspartylproteasen wurde anhand von Kristallstrukturen von Übergangszustand-Analoga im Komplex mit einem Protein aufgeklärt.<sup>[45-47, 63-65]</sup> Der in Abbildung 2.3 gezeigte Mechanismus beruht auf der Darstellung von Veerapandian et al.<sup>[64]</sup>

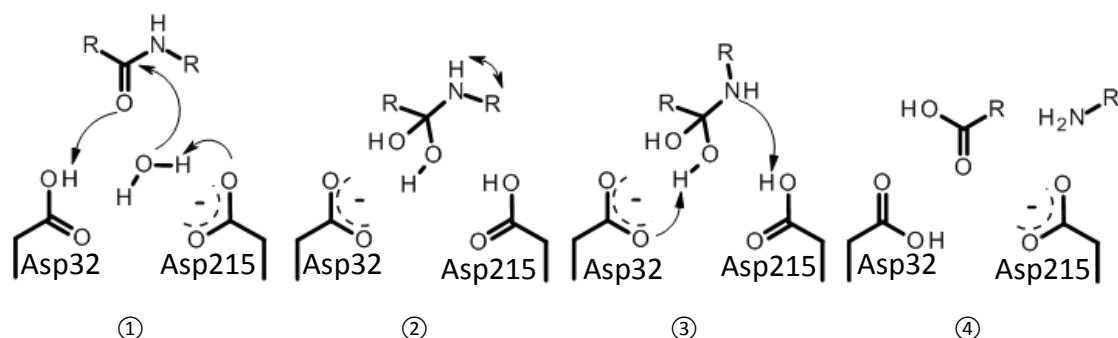


Abbildung 2.3: Der katalytische Mechanismus der Pepsin-ähnlichen Aspartylproteasen nach Veerapandian et al.<sup>[64]</sup> Die Aminosäuren sind in der Pepsin-Nummerierung angegeben.



Im unkomplexierten Zustand ist ein Wassermolekül, das katalytische Wasser, zwischen den beiden Aspartaten fixiert. Bindet ein Substrat in der Bindetasche, ist das durch die geladene katalytische Diade polarisierte Wasser in der Lage, den Carbonylsauerstoff des Substrats direkt anzugreifen ①. Der dadurch gebildete tetraedische Übergangszustand wird durch die beiden Aspartate stabilisiert ②. Eine Inversion des Stickstoffs ② ermöglicht diesem ein Proton von Asp215 zu abstrahieren ③. Gleichzeitig übernimmt Asp32 ein Proton aus dem Übergangszustand ③, wodurch dieser in die beiden Produkte zerfällt ④. Nachdem die Produkte aus der Bindetasche abdiffundiert sind, nimmt ein neues Wassermolekül die Position zwischen den katalytischen Aspartaten ein. Während der Katalyse ist das Substrat so in der Bindetasche positioniert, dass der Rest, welcher auf der Seite der entstehenden Säuregruppe gebunden ist, den Platz in der S1-Tasche besetzt. Der Rest auf der Seite der entstehenden Aminofunktion kommt in der S1'-Tasche zu liegen. Von besonderem Interesse ist der Protonierungszustand der beiden Aspartate vor und während der Katalyse. In Komplexen mit Übergangszustand-Analoga konnte mittels hochaufgelöster Röntgenstrukturen sowie Neutronenstrukturen Asp32 als deprotoniert und Asp215 als protonierte identifiziert werden.<sup>[45]</sup> Die Protonierungszustände außerhalb des Übergangszustandes sind hingegen spekulativ. Für den unkomplexierten Zustand ist eine Annahme, dass sich beide Aspartate das Proton sowie die negative Ladung teilen.<sup>[65]</sup>

Für den Katalyse-Mechanismus ist es von entscheidender Bedeutung, dass ein Aspartat protoniert ist, während das andere deprotoniert vorliegt und die beiden Aspartate zudem geometrisch richtig, also koplanar zueinander, ausgerichtet sind. Bei den pepsinähnlichen Aspartylproteasen sind die beiden katalytischen Aspartate durch benachbarte Aminosäuren stabilisiert. In aller Regel finden sich hier ein Threonin und ein Serin. Auffällig ist, dass in der HIV-Protease an dieser Stelle lediglich Alanine zu finden sind, also Aminosäuren welche nicht in der Lage sind eine Wasserstoffbrücke zu den Aspartaten auszubilden. Auch in Renin findet sich lediglich das Serin während das Threonin ebenfalls durch ein Alanin ersetzt ist. Da sowohl die HIV Protease als auch Renin ihr pH-Optimum im annähernd neutralen Bereich aufweisen, liegt die Vermutung nahe, dass eine solche Stabilisierung besonders unter sauren Bedingungen notwendig ist. Diese Annahme wird durch eine Mutationsstudie an der HIV-Protease unterstützt, die zeigt, dass ein künstliches Einfügen eines Serins neben einer Abnahme der Katalysegeschwindigkeit zu einer Verschiebung des pH-Optimums in den sauren Bereich zur Folge hat.<sup>[66]</sup> Darüber hinaus stehen die beiden inneren Sauerstoffe der Aspartate jeweils in Kontakt mit dem Stickstoff eines benachbarten Glycins.

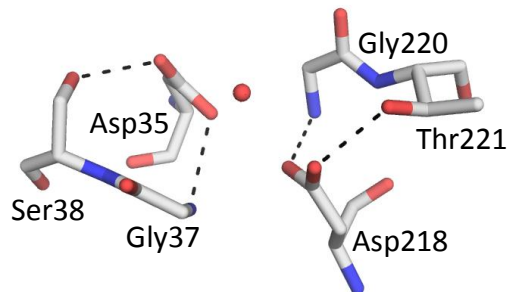


Abbildung 2.4: Die katalytische Diade wird durch benachbarte Aminosäuren stabilisiert. Für das Bild wurde die Endothiapepsin-Struktur mit dem PDB-Code 1OEW verwendet.<sup>[39]</sup>

## 2.4 Die Bindetasche

Die grundsätzliche Gestalt der Bindetasche ist in allen pepsinähnlichen Aspartylproteasen vergleichbar. Abbildung 2.5 zeigt die Bindetasche von Endothiapepsin sowohl in Aufsicht wie auch die Region um das katalytische Zentrum im Detail. Die Bindetasche ist relativ flach und durchzieht das Protein wie einen Graben um auch längere Peptidketten (bis zu etwa acht Aminosäuren) beherbergen zu können. Im Zentrum findet sich die durch eine flexible *Flap*-Region überdachte katalytische Diade. Die geöffnete *Flap* ermöglicht einem Substrat den Zugang zur Bindetasche und schließt sich anschließend über dem gebundenen Molekül, um es in optimaler Position über dem katalytischen Zentrum zu fixieren. Während die Binderegionen um die beiden Aspartate gut ausgebildet sind, werden diese Bereiche an den Rändern der Bindetasche zunehmend offener und unspezifischer. Durch den vornehmend hydrophoben Charakter der einzelnen Taschen ergibt sich die bevorzugte Spaltung zwischen hydrophoben Aminosäuren. Die Benennung der Taschen geht aus Abbildung 2.5 hervor. Neben diesen gibt es noch eine weitere hydrophobe Tasche welche lediglich bei geöffneter *Flap* zugänglich ist. Diese wird im nächsten Abschnitt eingehender diskutiert.

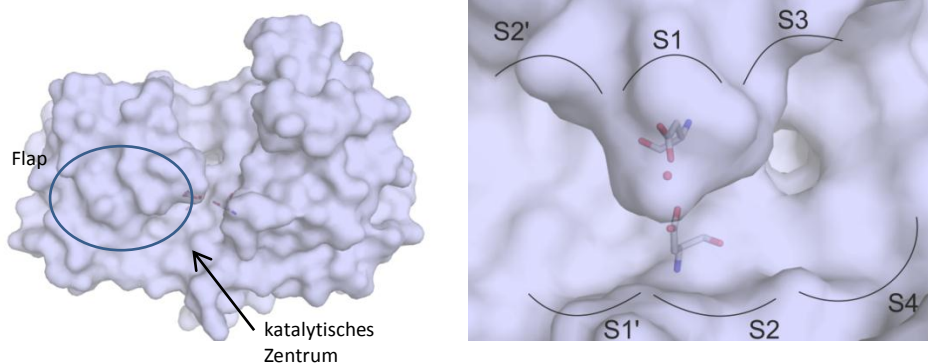


Abbildung 2.5: Die Bindetasche von Endothiapepsin in Aufsicht (links) sowie die Region um das katalytische Zentrum im Detail (rechts). Zur besseren Orientierung ist jeweils die katalytische Diade eingezeichnet.

## 2.5 Die *Flap*

Die *Flap* ist eine flexible  $\beta$ -Schleife welche oberhalb der katalytischen Diade positioniert ist. In den meisten Kristallstrukturen der pepsinähnlichen Aspartylproteasen ist die *Flap* über der Bindetasche geschlossen. In Komplexstrukturen stabilisieren die Liganden meist die geschlossene Konformation indem sie sowohl mit der katalytischen Diade als auch mit der *Flap*-Region in Wechselwirkung treten. Trotzdem wurden bereits mehrere Kristallstrukturen mit einer offenen *Flap* beschrieben und in der Proteindatenbank deponiert. So sind zum Beispiel von Plasmepsin II und der  $\beta$ -Sekretase Strukturen mit einer geöffneten *Flap* bekannt.<sup>[67-70]</sup> Oftmals ist hierbei die *Flap*-Region allerdings nur minimal geöffnet, wobei die konkrete Position der *Flap* von Struktur zu Struktur aufgrund ihrer hohen Flexibilität variiert. Abbildung 2.6 zeigt die Überlagerung einer Kristallstruktur mit offener und einer mit geschlossener *Flap* am Beispiel von Plasmepsin II. Die hier gezeigte Kristallstruktur mit offener *Flap* (PDB Code 2IGY<sup>[67]</sup>) stellt für die Plasmepsin II (und auch für die gesamte Familie der pepsinartigen Aspartylproteasen) die Struktur mit der am weitesten geöffnete *Flap* dar. Das bedeutet, im Vergleich zu der geschlossenen Form ist die Verschiebung der C $\alpha$  Atome an der Spitze der *Flap* am größten. Hier findet sich ein maximaler Abstand von 11.5 Å.<sup>[67]</sup>

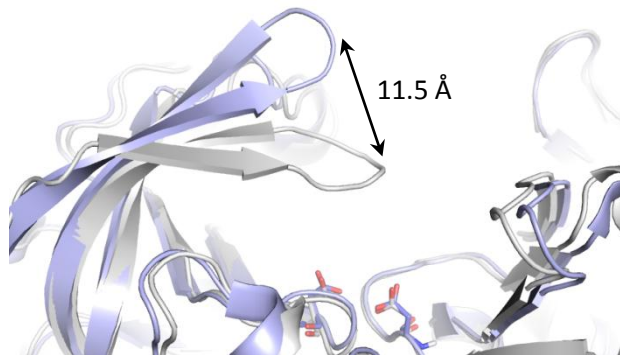


Abbildung 2.6: Überlagerung zweier Plasmepsin II Kristallstrukturen mit unterschiedlicher *Flap*-Öffnung.

In blauer *Cartoon*-Darstellung ist eine Struktur mit offener *Flap* dargestellt (PDB Code: 2IGY)<sup>[67]</sup>. In weißer *Cartoon*-Darstellung ist eine Struktur mit geschlossener *Flap* gezeigt (PDB Code: 1SME)<sup>[71]</sup>. Zur besseren Orientierung sind zusätzlich die katalytischen Aspartate dargestellt.

Die Öffnung der *Flap* verursacht einige strukturelle Änderungen der Bindetasche. So wurde sowohl in Plasmepsin II als auch in Renin die Öffnung einer zusätzlichen *Flap*-Tasche beobachtet. Eine entscheidende Rolle spielt dabei das *Flap*-Tyrosin, eine in der Proteinfamilie stark konservierte Aminosäure. Im geschlossenen Zustand vermittelt dieses Tyrosin den Kontakt zwischen der *Flap*-Region und der restlichen Bindetasche. Im Falle von Plasmepsin II bildet Tyr77 im geschlossenen, unkomplexierten Protein eine Wasserstoffbrückenbindung zu Trp41 sowie, vermittelt über ein Wassermolekül,

zu Ser37. Bei der Öffnung der *Flap* gehen diese Kontakte verloren. Trp41 kann nun eine zweite Konformation einnehmen und gibt damit den Zugang zu einer zusätzlichen hydrophoben Tasche („*Flap*-Tasche“) frei. In dieser Position kann Trp41 anstelle von Tyr77 die Wasserstoffbrücke zu dem Wassermolekül ausbilden. Abbildung 2.7 zeigt die offene und geschlossene Konformation von Plasmepsin II im Vergleich.

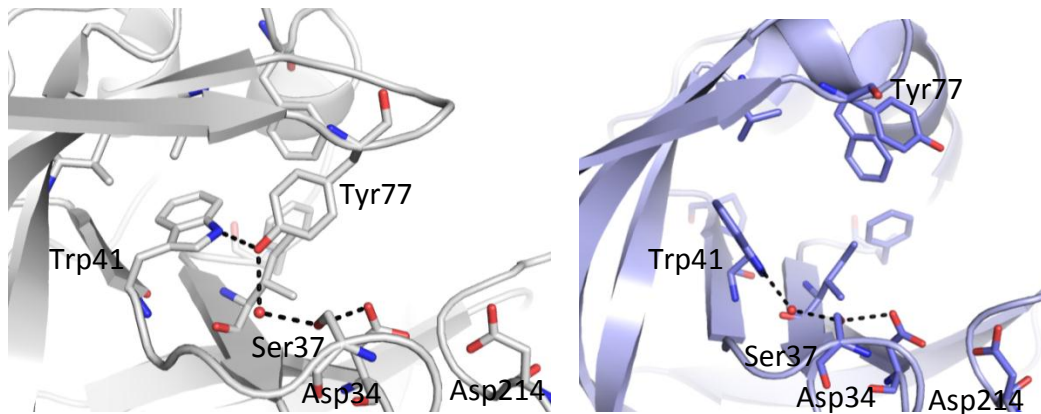


Abbildung 2.7 Die offene (rechts) und geschlossene (links) Form von Plasmepsin II. Für die Darstellung der geschlossenen Form wurde Plasmepsin II im Komplex mit Pepstatin gewählt (PDB code: 1SME).<sup>[71]</sup>

Für die Darstellung der offenen Form wurde ebenfalls eine Komplexstruktur verwendet (PDB code: 2BJU).<sup>[68]</sup> Es sind jeweils die Proteinkette in *Cartoon*-Darstellung sowie ausgewählt Aminosäuren dargestellt wobei die Kohlenstoffatome weiß (geschlossene Struktur) bzw. blau (offene Struktur) eingefärbt sind. Wasserstoffbrücken sind mit gestrichelten Linien angedeutet.

Für Renin ist in der offenen Konformation ebenfalls eine *Flap*-Tasche beobachtet worden.<sup>[72-74]</sup> Analog zu Plasmepsin II bildet Tyr75 (in Plm II Tyr77) eine Wasserstoffbrücke zu Trp39 (in Plm II Trp41) aus, welche bei der *Flap*-Öffnung verloren geht. Trp39 nimmt in der offenen Form ebenfalls eine neue Konformation ein und gibt somit die *Flap*-Tasche frei. In der PDB finden sich Renin-Strukturen mit geöffneter *Flap*-Tasche unter dem Code 3O9L, 3OAD und 3OAG.<sup>[75]</sup>

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die  $\beta$ -Sekretase an der Position des hier diskutierten Tryptophans lediglich ein Alanin besitzt. Als Ersatz befindet sich ein Tryptophan in der *Flap*-Region (Trp76) zu dem das *Flap*-Tyrosin (Tyr71) im geschlossenen Zustand die zweite Wasserstoffbrücke ausbildet.

In dieser Arbeit sind besonders Endothiapepsin und SAP2 untersucht worden. Von beiden Proteinen sind bisher keine Strukturen mit geöffneter *Flap* in der Proteindatenbank verfügbar. Da beide Proteine im geschlossenen Zustand das gleiche Muster von *Flap*-Tyrosin, Tryptophan und Wasser aufweisen wie es in Plasmepsin II und Renin beobachtet wurde, ist aber davon auszugehen dass hier ein analoges Verhalten möglich ist.

## 2.6 Inhibitoren

Im Laufe der letzten Jahre wurde eine Vielzahl an Inhibitoren für diese Proteinfamilie entworfen und synthetisiert. Einen guten Überblick bietet das Buch von Ghosh.<sup>[76]</sup> An dieser Stelle sollen lediglich beispielhaft einige Prinzipien vorgestellt werden.

Die ersten Inhibitoren, welche für die pepsinähnlichen Aspartylproteasen, und auch Aspartylproteasen im Allgemeinen, entwickelt wurden, sind so genannte Übergangszustandsanaloge. Sie imitieren in der Regel mit einer zentralen Hydroxygruppe, welche die Position zwischen den beiden Aspartaten einnimmt, den tetraedrischen Übergangszustand der Katalyse. Als Prototyp dient hier Pepstatin ein schon lange bekannter natürlicher Inhibitor mit hoher Affinität zu fast allen Aspartylproteasen. Mit der ungewöhnlichen Aminosäure Statin als zentralem Baustein kann Pepstatin an die katalytische Diade binden ohne von der Protease gespalten zu werden (Abbildung 2.8). Auf diesem Prinzip aufbauend sind eine Vielzahl von peptidomimetischen Inhibitoren entwickelt worden. Zwei exemplarische Beispiele dieser synthetischen Übergangszustandsanaloge sind in Abbildung 2.8 dargestellt. Verbindung 1 ist einer der ersten Plasmepsin Inhibitoren von dem eine Komplexstruktur bestimmt werden konnte.<sup>[77]</sup> Die Komplexstruktur von Verbindung 2 mit Endothiapepsin lieferte wertvolle Informationen über den katalytischen Mechanismus, da sie durch zwei Hydroxygruppen den tetraedrischen Übergangszustand noch besser imitiert. Die Grundstruktur dieser Verbindung ist an bekannte Renin-Inhibitoren angelehnt.<sup>[78]</sup>

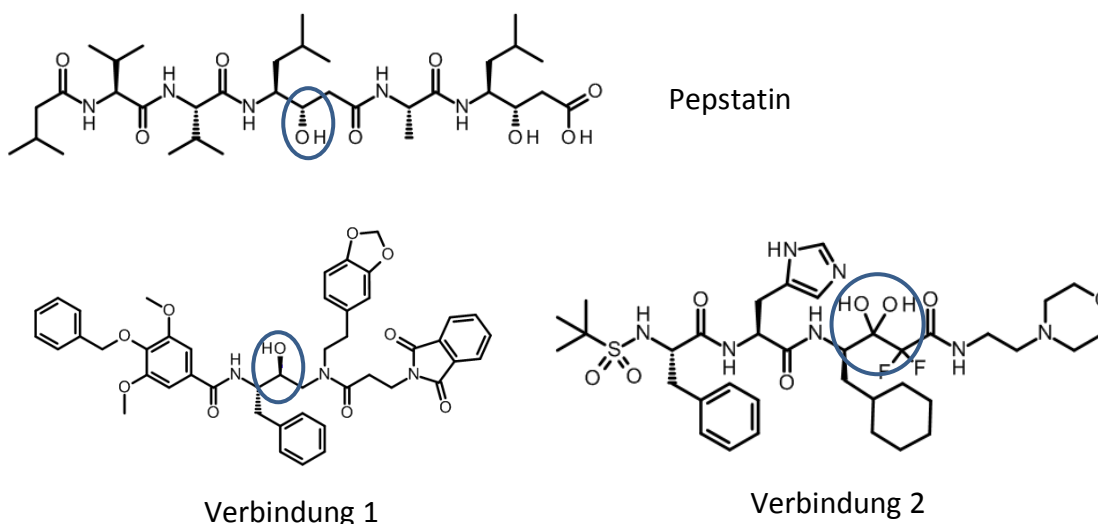


Abbildung 2.8: Übergangszustand-Analoga. Die Gruppe welche die katalytische Diade adressiert ist jeweils hervorgehoben. Pepstatin inhibiert die meisten Aspartylproteasen (z.B. Endothiapepsin PDB Code: 4ER2)<sup>[79]</sup>, Verbindung 1 ist ein Plasmepsin II-Inhibitor (PDB Code: 1LF3)<sup>[77]</sup>, Verbindung 2 wurde im Komplex mit Endothiapepsin kristallisiert (PDB Code: 1OD1)<sup>[47]</sup>.

Um den Arzneischatz zu erweitern, wurde schon bald im Rahmen verschiedener Projekte nach Alternativen zu den klassischen Peptidomimetika gesucht. Dabei wurden in den letzten Jahren besonders Stickstoffe zur Adressierung der katalytischen Diade verwendet. Neben Renin, den Plasmepsinen, Cathepsin D und den sekretorischen Aspartylproteasen wurde insbesondere für die  $\beta$ -Sekretase eine Vielzahl nicht-peptidischer Verbindungen synthetisiert. Abbildung 2.9 zeigt einige dieser Inhibitoren. Verbindung 3 wurde durch die Optimierung eines Treffer aus einem *High-Throughput* (engl.: Hochdurchsatz) *Screenings* mit der  $\beta$ -Sekretase erhalten und konnte erfolgreich kristallisiert werden.<sup>[80]</sup> Verbindung 4 ist in einem kristallographischen Fragmentscreen aufgefallen und lieferte ebenfalls eine Komplexstruktur.<sup>[81]</sup> Als drittes Beispiel sei hier Aliskiren angeführt, ein potenter Renin-Inhibitor, welcher im Zuge eines strukturbasierten Designs entwickelt wurde und mittlerweile als Arzneistoff zugelassen ist.<sup>[78]</sup>

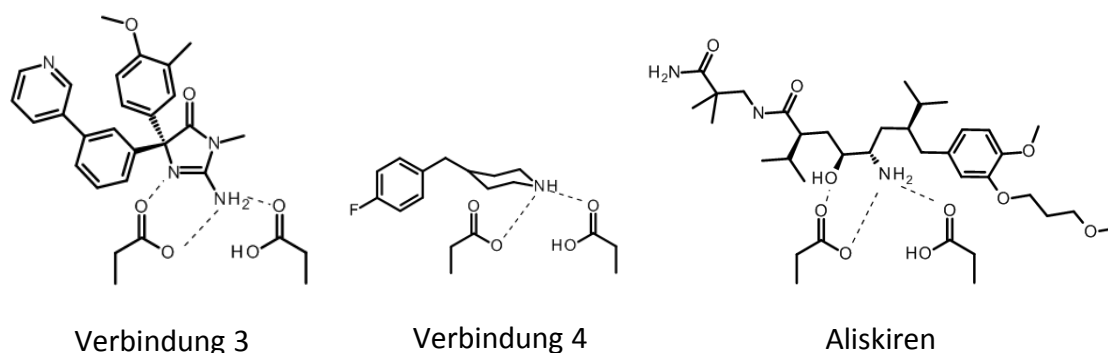


Abbildung 2.9: Beispiele für nicht-peptidische Inhibitoren. Verbindungen 3 und 4 wurden im Komplex mit der  $\beta$ -Sekretase kristallisiert, Aliskiren ist ein Renin-Inhibitor. Die Bindungsmodi beruhen auf den PDB-Einträgen 3INF<sup>[82]</sup>, 2OHN<sup>[81]</sup> sowie 2VOZ<sup>[83]</sup>.

Neben der direkten Bindung an die katalytische Diade wurde in einigen Fällen auch eine Adressierung über das zwischen den beiden Aspartaten gebundene Wasser beobachtet. So zeigt die Komplexstruktur zwischen Verbindung 5 und Plasmepsin II neben zwei gebundenen Molekülen und der Besetzung der *Flap*-Tasche eine unerwartete Adressierung der katalytischen Diade über ein Wassermolekül (Abbildung 2.10).<sup>[68]</sup>

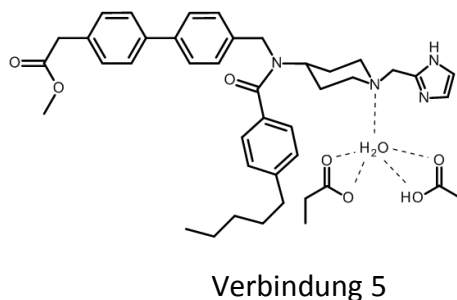


Abbildung 2.10: Beispiel für die über das katalytische Wasser vermittelte Bindung an die beiden Aspartate. Die Abbildung beruht auf dem PDB Eintrag 2BJU, wobei lediglich der an die beiden katalytischen Aspartate gebundene Inhibitor gezeigt ist.<sup>[68]</sup>

Trotz intensiver Bemühungen und der Vielzahl an synthetisierten Inhibitoren konnte bislang lediglich für Renin ein Arzneistoff mit Marktzulassung entwickelt werden. Zudem ist es mit Hinblick auf Resistenzen und Unverträglichkeiten erstrebenswert verschiedene Wirkstoffe mit unterschiedlichen Eigenschaften zur Verfügung zu haben. Unter diesem Hintergrund ist das Auffinden neuer Inhibitoren für pepsinartige Aspartylproteasen ein wichtiges Thema der Arzneimittelforschung.

### 3 Aspartylproteasen – Ergebnisse

Mit dem Ziel neue hochaffine Inhibitoren für die Familie der pepsinähnlichen Aspartylproteasen zu entwickeln wurden Verbindungen mit unterschiedlichen Grundgerüsten auf Endothiapepsin untersucht. Im Vordergrund dieser Arbeit stand dabei die kristallographische Aufklärung ihrer Bindungsmodi. Durch zusätzliche biochemische Methoden wurden die Verbindungen ergänzend charakterisiert. In den folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse der einzelnen Projekte vorgestellt.

In den ersten drei Kapiteln wird Endothiapepsin vorwiegend als Modellsystem für die Plasmepsine betrachtet. Neben der Aufklärung des Bindemodus für drei verschiedene Grundgerüste konnten dabei interessante Einblicke in Flexibilität der pepsinartigen Aspartylproteasen gewonnen werden. So wurde das katalytische Wasser bei der Ligandbindung in drei verschiedenen Rollen beobachtet. Es kann verdrängt werden um eine direkte Interaktion zu den katalytischen Aspartaten zu ermöglichen, aber auch als Wasserstoffbrücken Donor oder Akzeptor dienen um eine Ligandbindung zu vermitteln. Auch konnte erstmals eine Struktur von Endothiapepsin mit einer (teils ungeordneten) geöffneten *Flap* mit teilweiser geöffneter *Flap*-Tasche beschrieben werden. Und nicht zuletzt wurde experimentell eine zweifach deprotonierte katalytische Diade nachgewiesen.

Kapitel 3.4 beschäftigt sich mit dem Bindemodus von Ritonavir und Saquinavir. Obwohl schon lange bekannt ist, dass die klassischen HIV-Protease Inhibitoren auch gegenüber den pepsinartigen Aspartylproteasen affin sind, wird hier erstmals deren Bindungsmodus beschrieben.

Die letzten beiden Kapitel beschäftigen sich mit Fragment-basiertem Design auf Aspartylproteasen. Neben exemplarischen Strukturen mit dem sehr kleinen Benzamidin und einem größeren Fragment wurde eine Fragment-Bibliothek mit 364 Einträgen nach aktiven Fragmenten durchmustert und anschließend für 11 Fragmente eine Kristallstruktur bestimmt. Diese Kristallstrukturen weisen eine Vielzahl interessanter Bindungsmodi auf und geben Anlass die so genannte „*Rule-of-3*“, welche oft zum Zusammenstellen von Fragmentbibliotheken herangezogen wird, in einigen Punkten kritisch zu hinterfragen.



### 3.1 Inhibitoren basierend auf der Gewald Reaktion:

#### Drei Bindungsmodi geben Aufschluss über die Flexibilität des katalytischen Wassers

Mit Hilfe von Endothiapepsin als Modellsystem wurde der Bindungsmodus dreier Inhibitoren mit einem auf der Gewald-Reaktion basierendem Grundgerüst erfolgreich aufgeklärt. Diese Inhibitoren wurden als Plasmepsin Inhibitoren synthetisiert und zeigen hier eine erstaunliche Flexibilität in ihrem Bindungsmodus. So wurden in den drei erhaltenen Komplexstrukturen drei abweichende Bindungsmodi beobachtet. Der Vergleich zweier sich strukturell sehr ähnlicher Verbindungen, die nichtsdestotrotz grundverschiedene Bindungsmodi aufweisen, unterstreicht die Notwendigkeit einer kontinuierlichen kristallographischen Strukturaufklärung im Rahmen von Projekten des strukturbasierten Wirkstoffdesigns. Interessanterweise kommt dem katalytischen Wasser in jeder dieser Strukturen eine andere Rolle zu. So wird es einmal verdrängt, dient einmal als Wasserstoffbrücken-Donor und einmal als Wasserstoffbrücken-Akzeptor, was die hohe Flexibilität und Vielfalt dieses Wassers als Bindungspartner herausstellt.

#### 3.1.1 Einleitung

Basierend auf der Gewaldreaktion wurden von Ruben Bartholomäus im Rahmen seiner Diplomarbeit eine Vielzahl von Inhibitoren als potentielle Plasmepsininhibitoren synthetisiert. Die Grundstruktur der Gewaldinhibitoren wurde über eine FTrees<sup>[84]</sup> Suche gefunden und mit FlexX<sup>[85]</sup> gedockt. Abbildung 3.1 zeigt die Dockinglösung des mit FTrees gefundenen Thiophenderivats. Für detaillierte Informationen bezüglich der Leitstruktursuche und Dockingmethoden sei hier auf die Disseration von Torsten Luksch verwiesen.<sup>[86]</sup>

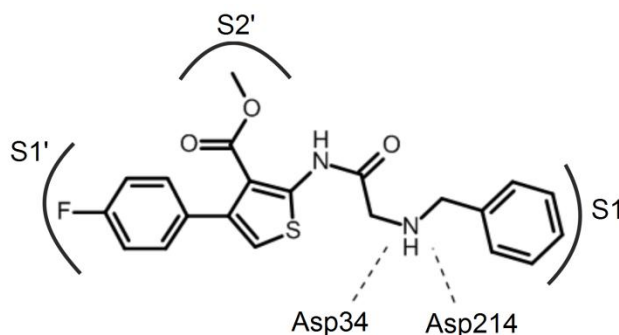
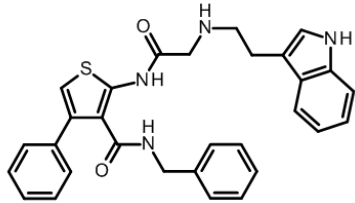


Abb 3.1. Dockinglösung des mit FTrees und FlexX gefundenen Thiophenderivats

Anhand dieses Bindungsmodus wurde versucht durch Variation der Reste die Adressierung der einzelnen Subtaschen zu optimieren und somit eine Affinitätssteigerung zu erreichen. Die synthetisierten Verbindungen wurden von Torsten Luksch sowohl gegen Plasmepsin II als auch Plasmepsin IV getestet. Die Ausgangsverbindung zeigte eine Affinität um 50  $\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}$ ) für beide Proteine. Zunächst wurde der Rest in der S1-Tasche variiert. Zusätzlich wurden verschiedene Substituenten (H, Cl, F) in para Stellung des Phenylrings in der S1'-Tasche getestet. Die Affinität konnte so in den einstellig  $\mu\text{M}$  Bereich verbessert werden. RB57 zeigt als einzige Verbindung eine einstellig  $\mu\text{M}$  Affinität gegen beide Plasmepsine (8.4 gegen Plasmepsin II und 5.1 gegen Plasmepsin IV). RB49 weist mit 4.8  $\mu\text{M}$  die beste Affinität auf (gegen Plasmepsin IV). Um eine weitere Affinitätssteigerung zu erreichen wurde der Rest in der S2'-Tasche vergrößert. Mit RB91 wurde lediglich eine Verbindung mit diesem Merkmal synthetisiert. RB91 ist mit 2.8  $\mu\text{M}$  gegen Plasmepsin II und 0.63  $\mu\text{M}$  gegen Plasmepsin IV die affinste Verbindung.

Überraschend ist, dass sowohl RB35 als auch RB57 eine gute Affinität aufweisen. RB35 adressiert die S1-Tasche mit einem Elektronenpaar Donor (Nitrogruppe), RB57 besitzt an dieser Stelle einen Elektronenpaar Akzeptor (Aminogruppe). Dass diese beiden komplementären Funktionalitäten lediglich einen kleinen Affinitätsunterschied verursachen, ist ungewöhnlich.

Zur Bestätigung des Bindungsmodus wurde der sekundäre Stickstoff, welcher die beiden Aspartate adressieren sollte, gegen einen Schwefel ausgetauscht. Da ein Schwefelatom im Gegensatz zu einem Stickstoff nicht in der Lage ist eine Wasserstoffbrücke zu den katalytischen Aspartaten auszubilden, war bei diesen Verbindungen mit einem Aktivitätsverlust zu rechnen. Bei RB66 konnte wie erwartet keine Inhibition festgestellt werden. RB69 hingegen weist mit beiden Enzymen eine Inhibition im zweistellig  $\mu\text{M}$  Bereich auf. Dies beweist, dass der ursprüngliche postulierte Bindungsmodus zumindest nicht für alle Inhibitoren angenommen werden kann.

ID	Verbindung	R =	PlmII $\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	PlmIV $\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]
RB91			2.8	0.63

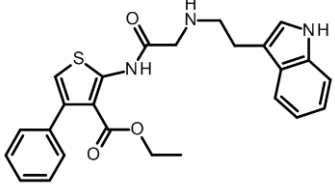
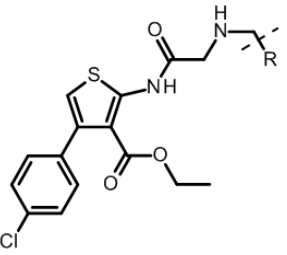
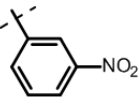
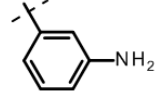
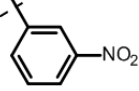
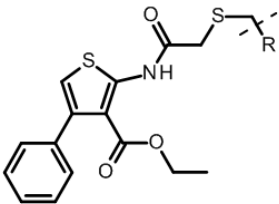
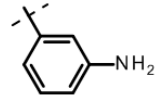
RB49			20	4.8
RB35			39	23
RB57			8.4	5.1
RB66			Keine Inhibition	Keine Inhibition
RB69			22	13

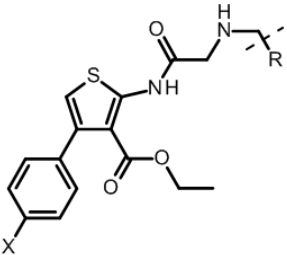
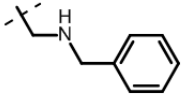
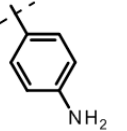
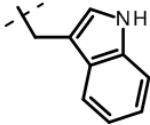
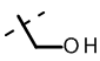
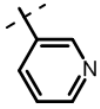


Tabelle 3.1 Inhibitionswerte ausgewählter Verbindungen gegen Plasmepsin 2 und Plasmepsin 4

Die nicht eindeutige Struktur-Wirkungsbeziehung anhand der Assayergebnisse machte es notwendig den Bindungsmodus der Inhibitoren experimentell aufzuklären. Die Methode der Wahl ist die Röntgenstrukturanalyse eines Inhibitor-Protein Komplexes. Optimal wäre eine Komplexstruktur mit einem der Plasmepsine. Da es nicht gelungen ist eine solche zu erhalten, wurde Endothiapepsin als Modellprotein gewählt. Endothiapepsin gehört ebenso wie die Plasmepsine zu den pepsinähnlichen Aspartylproteasen. Ein Sequenzvergleich von Endothiapepsin mit Plasmepsin II zeigt 24 % identische bzw. 57 % ähnliche Aminosäuren (berechnet mit FASTA).<sup>[87]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Inhibitoren mit Endothiapepsin getestet und kristallographisch untersucht.

### 3.1.2 Affinitätsbestimmungen

Um zu überprüfen inwieweit die Inhibitoren auch gegen Endothiapepsin aktiv sind, wurden alle Verbindungen gegen dieses Protein getestet. Dazu wurde die Aktivität der

Verbindungen bei 100  $\mu\text{M}$  Ligandkonzentration in einem fluoreszenzbasiertem Assay vermessen. Jeder Wert wurde zweifach bestimmt. Das hier in Tabelle 3.2 angegebene Ergebnis stellt den gemittelten Wert da. Die Inhibitionswerte für Plasmepsin II sowie Plasmepsin IV wurden aus der Diplomarbeit von Ruben Bartholomäus entnommen.<sup>[88]</sup> Beim Vergleich der Affinitäten ist zu beachten, dass die für Endothiapepsin bestimmte prozentuale Inhibition bei 100  $\mu\text{M}$  Ligandkonzentration ungenauer ist als  $K_i$  Werte und sich lediglich eignen um erste Tendenzen zu erkennen.

Verbindung	X =	R =	ID	PlmII $\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	PlmIV $\text{IC}_{50}$ [ $\mu\text{M}$ ]	EP Inh. bei 100 $\mu\text{M}$
	H		RB48	36	19	53 %
	H		RB51	13	17	84 %
	H		RB49	20	4,8	56 %
	H		RB53	92	51	k.l.
	H		RB50	35	40	58 %
	H		RB42	59	36	k.l.
	Cl		RB30	60	68	46 %

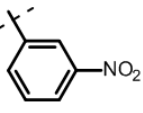
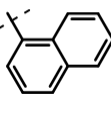
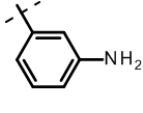
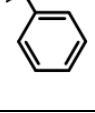
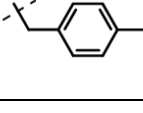
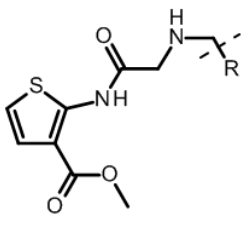
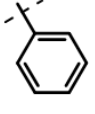
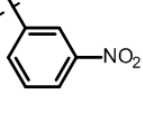
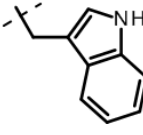
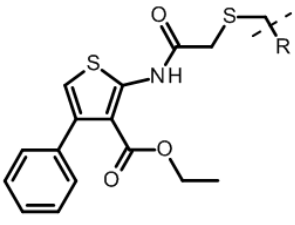
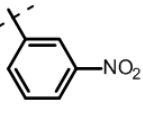
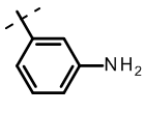
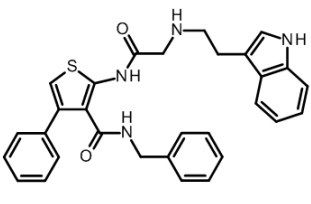
	Cl		RB35	39	23	k.l.
	Cl		RB34	54	28	40 %
	Cl		RB57	8,4	5,1	62 %
	F		RB31	52	50	20 %
	F		RB33	72	39	24 %
			RB71	183	37	k.l.
			RB72	214	14	k.l.
			RB73	53	9,6	22 %
			RB66	k.l.	k.l.	21 %
			RB69	22	13	k.l.
			RB91	2,8	0,63	100 %

Tabelle 3.2 Prozentuale Inhibition von Endothiapepsin im Vergleich mit Inhibitionswerten für Plasmepsin II und Plasmepsin IV. k.l. = keine Inhibition

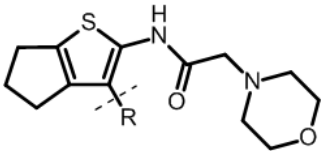
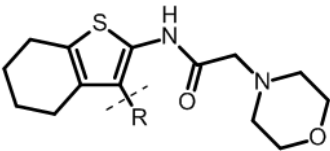

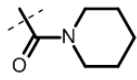
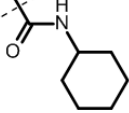
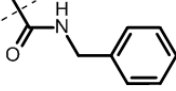
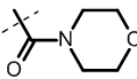
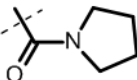
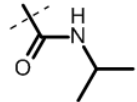
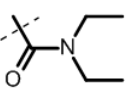
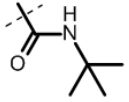
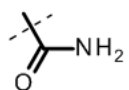
Ein Vergleich der Inhibition von Plasmepsinen mit der für Endothiapepsin zeigt einige gemeinsame Tendenzen. So ist für alle Enzyme RB91 die beste Verbindung. RB51 die für Endothiapepsin eine gute Inhibition zeigt, erreicht auch für die Plasmepsine eine überdurchschnittliche Affinität. Es gibt allerdings auch einige Abweichungen. Von besonderem Interesse ist das unterschiedliche Verhalten der Verbindungen RB66 und RB69 welche anstelle des sekundären Stickstoffs ein Schwefelatom aufweisen. Während RB69 in der Lage ist beide Plasmepsine zu hemmen, zeigt die Verbindung keinen Effekt an Endothiapepsin. Umgekehrt hemmt RB66 Endothiapepsin in schwachem Ausmaß nicht aber die Plasmepsine.

Die Inhibitoren, die Endothiapepsin bei 100  $\mu$ M zu mehr als 50 % inhibieren, wurden für die weitere kristallographische Untersuchung verwendet.

#### *Weitere Inhibitoren zum Ausleuchten der S2-Tasche*

Da eine Kristallstruktur einer der oben genannten Inhibitoren mit einem der Plasmepsine, Endothiapepsin oder einer anderen Aspartylprotease lange Zeit nicht verfügbar war, wurden von Amir Shahim weitere Inhibitoren mit einem Gewaltgrundgerüst synthetisiert. Durch einen Vergleich der Affinitäten der einzelnen Inhibitoren sollten weitere Hinweise auf den Bindungsmodus erhalten werden. Bei dieser Serie wurde der Thiophenring entweder um ein fünf-, bzw. sechsgliedriges Ringsystem erweitert. Auf diese Weise lassen sich Rückschlüsse auf den vorhandenen Platz der entsprechenden Binderegion ziehen. Der Schwerpunkt dieser Serie liegt allerdings auf der Ausleuchtung der S2-Tasche. Dazu wurden an dieser Stelle eine Vielzahl verschiedener Substituenten eingebracht. Um eine bessere Löslichkeit der Verbindungen zu erreichen, wurde in allen Fällen zur Adressierung der S1-Tasche ein Morpholinring gewählt.

Diese Verbindungen wurden lediglich gegen Endothiapepsin vermessen. Dazu wurden alle Verbindungen in dem fluoreszenzbasierten Assay bei 100  $\mu$ M getestet, wobei jeder Wert zweifach bestimmt wurde. Das in Tabelle 3.3 angegebene Ergebnis stellt den gemittelten Wert da. Vier Verbindungen konnten nicht vermessen werden, eine aufgrund zu hoher Eigenfluoreszenz und drei weitere aufgrund ihrer zu geringen Löslichkeit.

Grundgerüst				
Substituent	ID	% Inhibition bei 100µM mit EP	ID	% Inhibition bei 100µM mit EP
	AM6	24 %	SH28	--
	AM7	28 %	SH36	26 %
	AM8	24 %	SH37	k.l.
	AM11	over	SH40	60 %
	AM15	k.l.	SH39	k.l.
	AM16	32 %	SH33	33 %
	AM18	28 %	SH43	30 %
	AM20	k.l.	SH38	k.l.
	AM21	--	SH41	20 %
	AM22	--	SH42	32 %

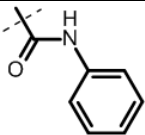
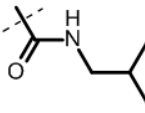
	AM23	k.I.	SH25	k.I.
	AM19	k.I.	SH44	k.I.

Tabelle 3.3: Weitere Verbindungen mit einem Grundgerüst basierend auf der Gewalddreaktion und ihre Inhibition bei 100µM gegen Endothiaepsin. k.I. = keine Inhibition, over = nicht bestimmbar aufgrund zu hoher Eigenfluoreszenz, -- = nicht bestimmbar aufgrund zu geringer Löslichkeit

Die Inhibitionswerte für die Verbindungen mit einem fünfgliedrigen Ringsystem am Thiophenring unterscheiden sich nicht signifikant von denen mit einem sechsgliedrigen Ringsystem. Zudem fällt auf, dass die Inhibition der meisten Verbindungen eher gering ist. SH40 zeigt mit 60 % die mit Abstand beste Inhibition. Somit wurde SH40, zusätzlich zu den besten Verbindungen der ersten Serien, für eine kristallographische Untersuchung ausgewählt.

#### *Bestimmung der $K_i$ Werte für RB91, RB49 und SH40*

Im weiteren Verlauf konnte für RB91, RB49 und SH40 eine Kristallstruktur im Komplex mit Endothiaepsin erhalten werden. Damit sind diese Verbindungen für potentielle weitere Untersuchungen besonders interessant. Der  $K_i$  Wert ermöglicht es, die Affinität aus dem fluoreszenzbasiertem Assay mit der Affinität aus anderen Assaysystemen zu vergleichen. Mit Hilfe entsprechender Verdünnungsreihen wurde versucht die  $K_i$  Werte dieser drei Inhibitoren zu bestimmen. RB49 und SH40 waren besonders bei hohen Konzentrationen unter den Assaybedingungen schlecht löslich. Da mit der maximal einsetzbaren Konzentration keine Vollinhibition des Proteins erreicht werden konnte, ließen sich die Werte für RB49 und SH40 nicht exakt bestimmen.

ID	$K_i$ für EP
RB91	132 nM
RB49	ca. 25 µM
SH40	im mittleren zweistellig µM Bereich

Tabelle 3.4:  $K_i$  Werte für Endothiaepsin von RB91, RB49 und SH40



RB91 zeigt eine gute Inhibition von 132 nM und setzt sich damit deutlich von allen anderen Inhibitoren dieser Serie ab. Auch gegen beide Plasmepepsine ist RB91 der affinste Inhibitor.

### 3.1.3 Bestimmung der Kristallstrukturen

Die Inhibitoren mit den besten Affinitätswerten für Endothiapepsin wurden für den Versuch einer kristallographischen Strukturaufklärung ausgewählt. Von insgesamt drei dieser Verbindungen (RB91, RB49, SH40) gelang es durch Kokristallisation mit anschließendem Soaking eine Kristallstruktur zu erhalten. Die Inhibitorkonzentration während der Kokristallisation betrug 2 mM. Die so gewonnenen Kristalle wurden anschließend für zwei Tage in einer Lösung mit einer Inhibitorkonzentration von 10 mM (RB91, RB49) bzw. 5 mM (SH40) aufbewahrt, bevor die Kristalle in flüssigem Stickstoff schockgefroren wurden. Die Datensätze aller drei Kristalle wurden an Synchrotrons gesammelt. Die Kristalle mit RB91 sowie RB49 wurden am SLS (Swiss Light Source), der Kristall mit SH40 wurde am BESSY (Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung) vermessen.

#### *Der Komplex von Endothiapepsin mit RB91*

Der Datensatz von Endothiapepsin im Komplex mit RB91 erreichte mit 1.43 Å eine gute Auflösung. Die Differenzdichte zeigt klar den in der Bindetasche gebundenen Inhibitor (Abb. 3.2). Neben RB91 sind in der Bindetasche noch weitere Liganden zu finden. Es handelt sich um zwei Moleküle PEG sowie ein Molekül DMSO (Abb. 3.3).

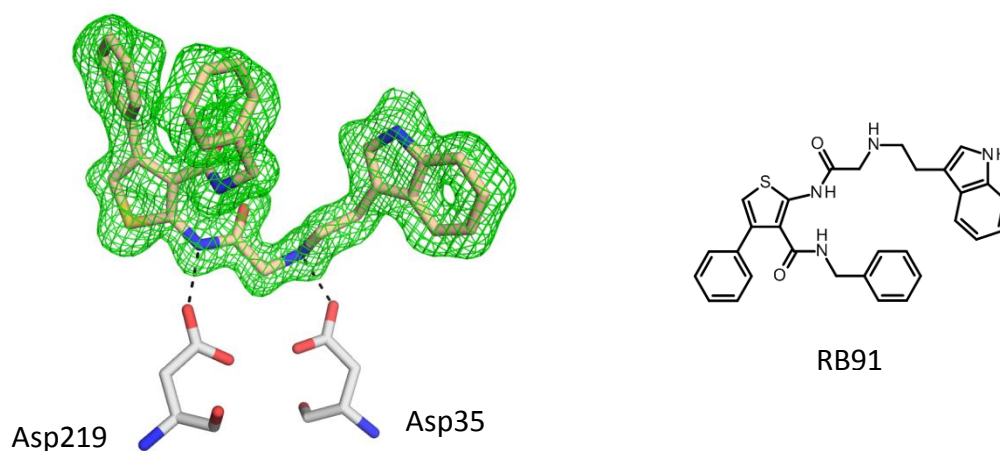


Abbildung 3.2: Links: Bindung von RB91 an die katalytische Diade. In grün ist die Differenzdichte  $mF_o - DF_c$  bei  $2.0 \sigma$  wiedergegeben. Rechts: Strukturformel von RB91.

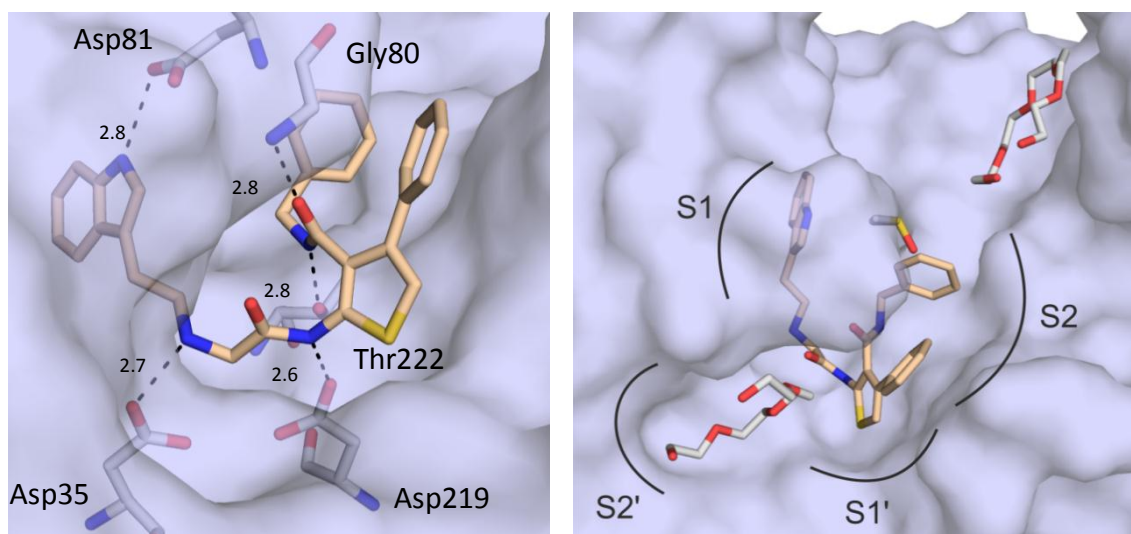


Abbildung 3.3: Links: Bindungsmodus von RB91. Die Abstände der Wasserstoffbrücken sind in Å angegeben. Rechts: Überblick über alle Liganden in der Bindetasche.

RB91 bindet an die katalytische Diade indem es zu jedem der zwei Aspartate eine Wasserstoffbrücke ausbildet. Asp35 wird mit dem sekundären Stickstoff adressiert, Asp219 mit einem der Amidstickstoffe. Der Indolrest ragt in die S1-Tasche und bildet dort eine Interaktion mit dem *Flap*-Aspartat (Asp81) aus. Der Thiophenring liegt in der S1'-Tasche, der über eine Einfachbindung angefügter Phenylring kommt zwischen der S1'- und S2-Tasche zu liegen. Der Phenylring hinter der Amidbindung adressiert Teile der S2-Tasche. Die Amidgruppe vermittelt eine Interaktion vom Boden der Bindetasche (Thr222) an die *Flap* (Gly80). Insgesamt geht der Inhibitor fünf Wasserstoffbrücken mit dem Protein ein, die Bindungslängen im optimalen Bereich zwischen 2.6 – 2.8 Å aufweisen.

Das DMSO Molekül bindet in der Nähe des Inhibitors am Boden der Bindetasche. Der Abstand des Sauerstoffs zu dem Rückgrat-Stickstoff von Thr223 beträgt 3.0 Å. Der Abstand zu einem Wasser, welches eine Interaktion zu Leu224 sowie Tyr226 vermittelt, beträgt 2.8 Å.

Ein PEG Molekül bindet in der Nähe des Inhibitors in der S2'-Tasche. Im Zentrum des sich ringförmig anordnenden PEG-Moleküls ist ein Wassermolekül gebunden. Dieses Wasser weist zu vier der fünf Sauerstoffe des PEG einen Abstand von 3.0 Å auf und ist zudem mit 2.8 Å an eine Carbonylfunktion der Proteinkette gebunden. Aufgrund der hohen Koordinationszahl ist es denkbar, dass anstelle des Wassermoleküls ein Natriumion vorliegt. Da anhand der beobachteten Dichte nicht eindeutig entschieden werden konnte, ob ein Wasser oder Natrium vorliegt, wurde an dieser Stelle ein Wassermolekül angenommen. Das zweite PEG Molekül bindet am gegenüberliegenden äußeren Rand der Bindetasche. Hier konnte kein eindeutig identifizierbares zentrales

Molekül beobachtet werden. Die Besetzung dieses PEG wurde auf 78 % verfeinert. Die anderen Liganden ließen sich mit voller Besetzung verfeinern.

In der Proteindatenbank gibt es eine große Zahl von Proteinstrukturen, die ein PEG-Molekül enthalten, wobei dieses in vielfältigen Konformationen vorliegt. Auch die hier vorliegende ringförmige angeordnete Konformation wird häufig beobachtet. Oft ist dabei die zentrale Position in der angedeuteten Ringmitte durch eine geladene Aminogruppe des Proteins, ein Wassermolekül oder ein Ion besetzt. Auch die Position in flachen, dem Lösungsmittel zugewandten Proteintaschen wird oft beobachtet (Vergleich z.B. PDB-Codes: 2HCH<sup>[89]</sup>, 3M62<sup>[90]</sup>, 3MZZ<sup>[91]</sup>).

Die Struktur von RB91, gebunden an Endothiapepsin, wurde in der PDB unter dem Code 3PSY hinterlegt.

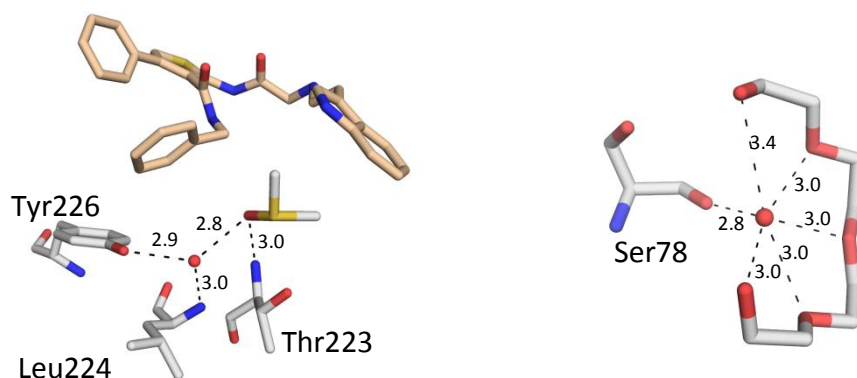


Abbildung 3.4: Links: Die Umgebung des DMSO Rechts: Die Umgebung des PEG. Die Entfernungen der Wasserstoffbrücken sind in Å angegeben

### *Der Komplex von Endothiapepsin mit RB49*

Auch dieser Datensatz von Endothiapepsin im Komplex mit RB49 weist mit 1.30 Å eine hohe Auflösung auf. Obwohl die Differenzdichte an einigen Stellen nur schlecht definiert ist, konnte der Ligand nach einigen Verfeinerungszyklen stimmig platziert werden (Abb. 3.5). Der Phenylring am Thiophen des Liganden wurde im Modell nicht berücksichtigt, da dieser in der Dichte nicht eindeutig zu erkennen ist. Zusätzlich zu dem Inhibitor binden noch ein DMSO Molekül sowie ein Acetat Ion in der Bindetasche. Ein weiteres Dichtezentrum im Bereich vor der S1'-Tasche konnte keinem in der Kristallisationslösung enthaltenem Liganden zugeordnet werden und wurde somit im Model nicht berücksichtigt. Die Besetzung von RB49 wurde auf 70 % verfeinert. Während das Acetat Ion voll besetzt ist, läuft die Verfeinerung der Besetzung des DMSO Moleküls nur auf 68 %.

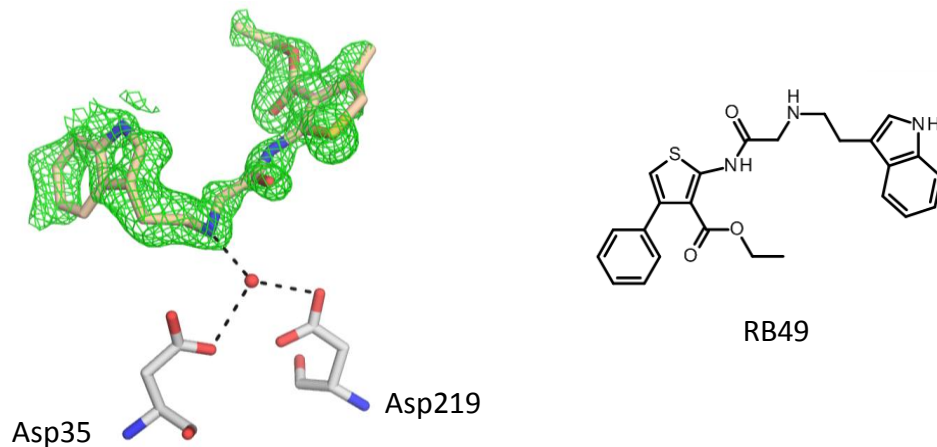


Abbildung. 3.5: Links: Bindung von RB49 an die katalytische Diade. In grün ist die Differenzdichte  $mF_o-DF_c$  bei  $2.0 \sigma$  wiedergegeben. Rechts: Strukturformel von RB49

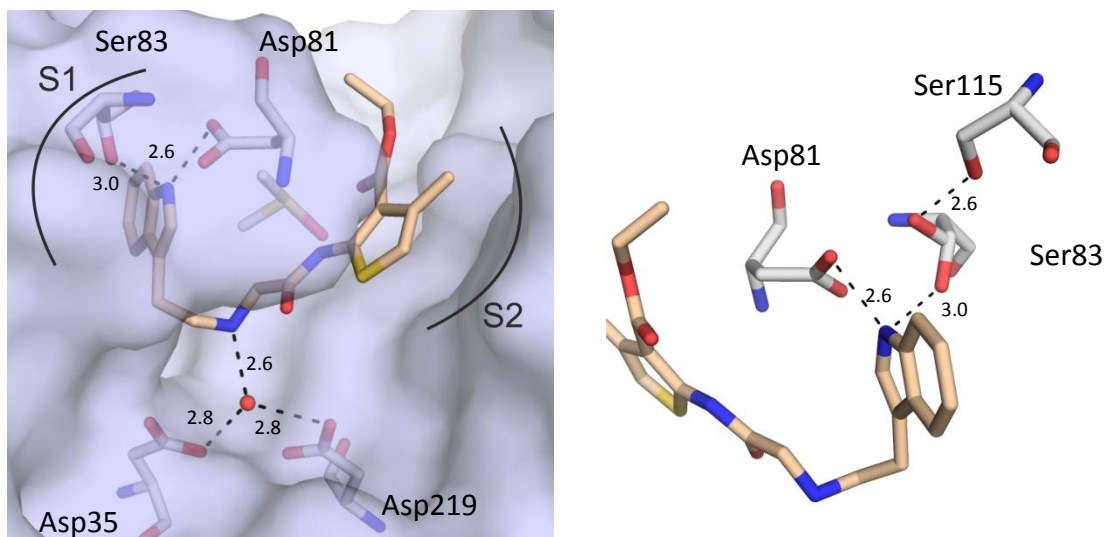


Abbildung 3.6: Links: Bindungsmodus von RB49. Rechts: Doppelte Konformation von Ser83. Die Entfernungen der Wasserstoffbrücken sind in Å angegeben.

RB49 bindet mit seinem sekundären Stickstoff über das katalytische Wasser an die beiden Aspartate. Dieses Wasser sitzt dabei exakt auf derselben Position wie in Strukturen, die keinen an die Aspartate gebundenen Liganden aufweisen (z.B. PDB Codes 3PGI<sup>[92]</sup> und 1OEW<sup>[39]</sup>). Die Entfernung des Stickstoffs zu dem Wasser beträgt  $2.6 \text{ \AA}$ , liegt also im optimalen Bereich für eine Wasserstoffbrückenbindung. Der Indolrest befindet sich in der S1-Tasche an derselben Position wie der Indolrest von RB91. Neben der starken Wasserstoffbrücke zu Asp81 ( $2.6 \text{ \AA}$ ) wird eine zweite schwächere Interaktion zu Ser83 ausgebildet ( $3.0 \text{ \AA}$ ). Ser83 liegt in zwei Konformationen vor. Während die eine Konformation die Wasserstoffbrücke zum Liganden ermöglicht, bildet die andere Konformation eine Interaktion zu Ser115 aus.

Die Besetzung der dem Liganden zugewandten Konformation beträgt 70 %, was sich mit der Besetzung des Liganden deckt. Ein Vergleich mit der Struktur von RB91 zeigt, dass auch dort Ser83 dem Liganden zugewandt ist. Allerdings beträgt hier die Entfernung lediglich 3.4 Å. In unkomplexierten Strukturen und Beispielen in denen keine Interaktion zu Ser83 ausgebildet wird, lässt sich meist die nach innen gerichtete Konformation antreffen. Somit ist nicht eindeutig festzustellen, ob RB49 die Konformation von Ser83 maßgeblich beeinflusst.

Das DMSO Molekül befindet sich an exakt der gleichen Position wie in der Struktur mit RB91. Da die Besetzung des DMSO annähernd der Besetzung von RB49 entspricht, lässt sich auch hier annehmen, dass das DMSO nur in Anwesenheit des Inhibitors an dieser Stelle bindet. Zusätzlich befindet sich ein Acetat Ion in der S2'-Tasche. Dieses bildet über Wasser vermittelt Interaktionen sowohl zu Asp40, Gly39 sowie Leu133 aus (Abb. 3.7).

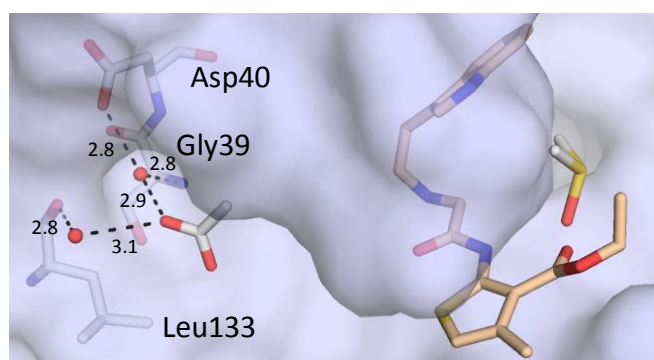


Abbildung 3.7: Bindemodus des Acetats in der S2'-Tasche

Die Struktur von Endothiapepsin im Komplex mit RB49 wurde unter dem Code 3T7Q in der Proteindatenbank hinterlegt.

#### *Der Komplex von Endothiapepsin mit SH40*

Mit 1.27 Å ist auch dieser Datensatz von Endothiapepsin im Komplex mit SH40 gut aufgelöst. Obwohl die Differenzelektronendichte für den Liganden an vielen Stellen unvollständig bleibt, konnte dieser nach einigen Verfeinerungszyklen eindeutig in der Differenzdichte platziert werden (Abb. 3.8). Da auch hier für den Phenylring keine Dichte zu erkennen ist, wurde dieser Teil im Modell nicht berücksichtigt. Die Besetzung des Inhibitors wurde auf 65 % verfeinert. In der Bindetasche befindet sich zusätzlich, exakt an der derselben Position wie in der Komplexstruktur von RB49, ein Acetat in der S2'-Tasche.

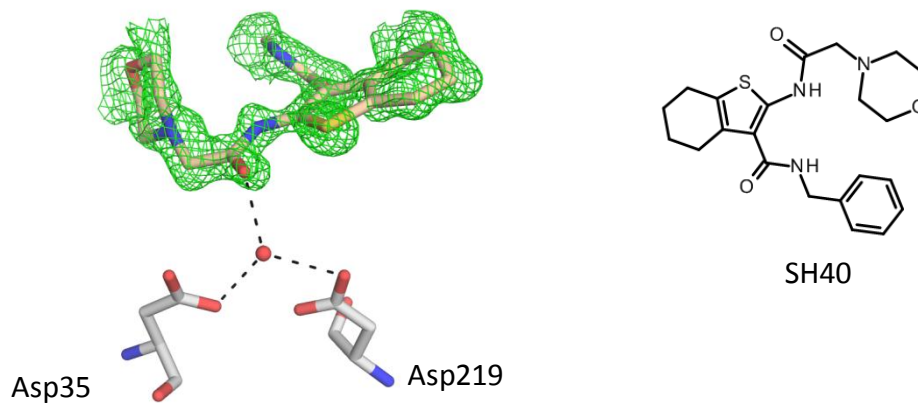


Abbildung: 3.8: Links: Bindung von SH40 an die katalytische Diade. In grün ist die Differenzdichte  $mF_o-DF_c$  bei  $2.0 \sigma$  wiedergegeben. Rechts: Strukturformel von SH40

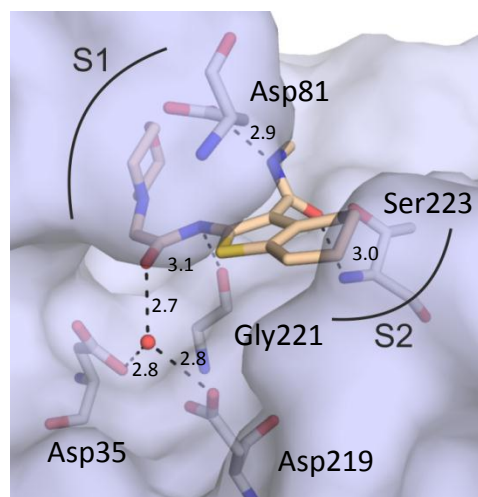


Abbildung.: 3.9: Bindungsmodus von SH40. Die Entfernungen der Wasserstoffbrücken sind in Å angegeben.

SH40 bindet über eine Carbonylfunktion an das katalytische Wasser. Der Abstand beträgt dabei 2.7 Å. Wie auch bei RB49 befindet sich das Wasser auf derselben Position wie in Strukturen die keinen an die Aspartate gebundenen Liganden aufweisen (z.B. PDB Codes 3PGI<sup>[92]</sup> und 1OEW<sup>[39]</sup>). Der Amidstickstoff bindet über eine lange Wasserstoffbrücke (3.1 Å) an Gly221. Mit der Amidfunktion interagiert der Ligand sowohl mit dem Boden der Bindetasche als auch mit der *Flap*. So adressiert der Carbonylsauerstoff Ser223 während der Amidstickstoff mit Asp81 interagiert.

Diese Struktur von Endothiapepsin im Komplex mit SH40 wurde unter dem Code 3T7X in der Proteindatenbank hinterlegt.

### Kristallographische Tabelle

Inhibitor	RB91	RB49	SH40
PDB Code	3PSY	3T7Q	3T7X
<b>Datensammlung und Prozessierung</b>			
Sammlungsort	SLS	SLS	BESSY (BL 14.2)
$\lambda$ [Å]	1.000	1.000	0.91841
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>
Einheitszellkonstanten			
a [Å]	45.5	45.4	45.4
b [Å]	73.1	73.1	73.2
c [Å]	52.8	52.8	53.0
$\beta$ [°]	109.5	109.7	109.8
Auflösung [Å]	40 - 1.43	40 - 1.30	25 - 1.27
Höchste Auflösungsschale	1.45 - 1.43	1.32 - 1.30	1.29 - 1.27
Anzahl einzelner Reflexe	55570	78609	84384
R <sub>sym</sub> [%] <sup>a</sup>	3.4 (28.5)	6.3 (41.6)	4.0 (16.1)
Vollständigkeit [%] <sup>a</sup>	92.8 (87.3)	98.6 (83.6)	98.0 (81.1)
Redundanz <sup>a</sup>	3.5 (3.3)	3.3 (2.4)	3.1 (2.5)
I/ $\sigma$ <sup>a</sup>	34.2 (4.2)	20.1 (2.2)	23.8 (6.1)
<b>Verfeinerung</b>			
Verwendetes Program	SHELXL	PHENIX	PHENIX
Anisotrop verfeinert	Ja	Nein	Nein
Letzter R <sub>free</sub> <sup>b</sup>	16.7	17.5	16.9
Letzter R <sub>work</sub> <sup>b</sup>	12.8	16.2	15.4
Anzahl Wassermoleküle	235	420	409
Ramachandran Diagramm			
Bevorzugte Regionen (%)	93.9	94.2	93.5
Erlaubte Regionen (%)	6.1	5.8	6.5
Erweiterte erlaubte Regionen (%)	0	0	0
Verbotene Regionen (%)	0	0	0
Durchschnittliche B-Werte (Å <sup>2</sup> )			
Protein Atome	14.3	11.1	9.2
Wasser Moleküle	26.9	24.5	21.9
Inhibitor	16.3	21.4	17.2
Andere Liganden <sup>c</sup>	35.2	19.3	21.9
RMSD Bindungslängen [Å]	0.010	0.005	0.005
RMSD Bindungswinkel [°]	2.7	1.1	1.1

<sup>a</sup> Wert in Klammern bezieht sich auf die höchste Auflösungsschale

<sup>b</sup> die angegebenen R-Werte beziehen sich jeweils auf die gesamten Daten

<sup>c</sup> andere Liganden sind Glycerol und/oder DMSO und/oder PEG und/oder Acetat

Tabelle 3.5: Kristallographische Tabelle



### 3.1.4 Diskussion

In den drei aufgeklärten Kristallstrukturen sind drei unterschiedliche Bindungsmodi zu beobachten. Die große Flexibilität mit dem dieses Grundgerüst an das Protein binden kann, erklärt, warum eine eindeutige Struktur-Wirkungs-Beziehung kaum zu erstellen war. Um zu verstehen, wie es zu den verschiedenen Bindemodi kommt, sollen im Folgenden insbesondere die Strukturen von RB49 und RB91 miteinander verglichen werden. Endothiapepsin dient in dieser Studie als Modell für die Plasmepepsine. Von diesem Hintergrund soll diskutiert werden, inwieweit sich der in Endothiapepsin gefundene Bindemodus übertragen lässt. Auch der Vergleich mit der zu Anfang vorgestellten Docking-Lösung ist hier von Interesse.

Darüber hinaus bieten die hier vorgestellten Strukturen auch einen interessanten Einblick in die Eigenschaften des katalytischen Wassers.

#### *Ursachen für die verschiedenen Bindemodi*

Besonders interessant ist der Vergleich von RB91 und RB49, da diese Inhibitoren sich in großen Teilen gleichen. Der Unterschied liegt nur in einer Seitenkette: dort wo RB49 einen Ethylester aufweist, findet sich bei RB91 ein Benzylamid. Trotz ihrer Ähnlichkeit ist RB91, verglichen mit RB49, um den Faktor 200 affiner. Die Kristallstrukturen helfen, diesen Affinitätsunterschied zu erklären. Abb. 3.10 zeigt eine Überlagerung der beiden Strukturen.

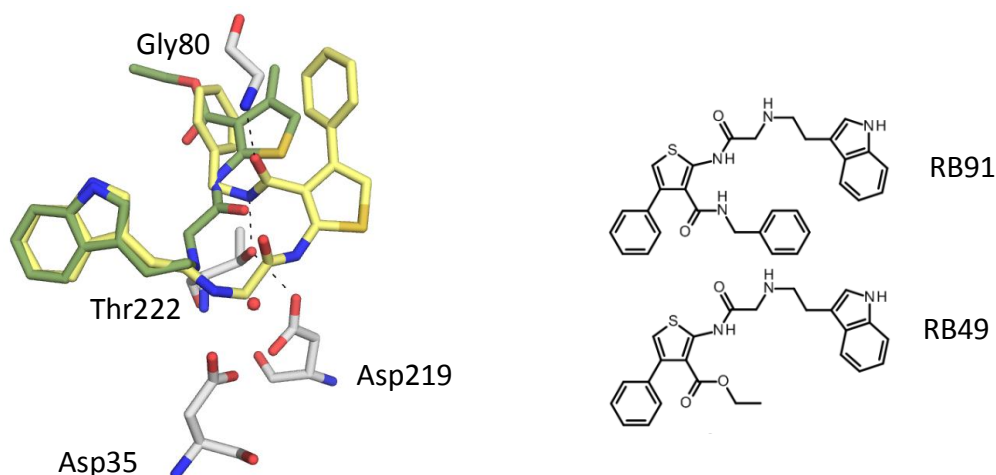


Abbildung 3.10: Überlagerung der Strukturen von RB91 und RB49. Die Kohlenstoffatome von RB91 sind gelb, die von RB49 grün und die des Proteins weiß dargestellt. Mit gestrichelten Linien sind ausgewählte Interaktionen hervorgehoben.



Beide Inhibitoren binden mit ihrem Indolrest nahezu deckungsgleich in der S1-Tasche. Während RB91 jedoch die beiden Aspartate direkt adressiert, bindet RB49 lediglich indirekt über ein Wassermolekül. RB91 platziert seine zweite Amidgruppe so, dass zwei sehr gute Interaktionen ausgebildet werden können (zu Thr222 und zu Gly80) während die Esterfunktion von RB49 keine Wasserstoffbrücken ausbildet. Im Folgenden sollen die möglichen Gründe für den, trotz der großen strukturellen Ähnlichkeit, so unterschiedlichen Bindemodus diskutiert werden. Dabei ist insbesondere die Frage interessant, weshalb RB49 nicht den Bindemodus von RB91 einnimmt.

Wird RB49 hypothetisch an die Stelle von RB91 positioniert, lassen sich prinzipiell zwei Unterschiede im Bindungsmodus ausmachen. Zum einen würde RB49 der Phenylring fehlen, der vor die S2-Tasche platziert wird. Zum anderen würde RB49 die Hydroxygruppe von Thr222 mit einem Ester-Sauerstoff anstelle eines Amid-Stickstoffs adressieren. Ein Sauerstoff kann lediglich als Wasserstoffbrücken Akzeptor fungieren. Somit müsste die Hydroxygruppe von Thr222 ihr Proton für die Interaktion mit RB49 zur Verfügung stellen. Bei dem Bindemodus von RB91 lässt sich anhand des Interaktionsmusters schließen, dass sich das Proton von Thr222 auf Asp219 richtet. Somit schließt sich für RB49 ein analoges Interaktionsmuster aus.

Der Phenylring in RB91 ist ein im Vergleich zu RB49 zusätzlicher Substituent, der in die S2-Tasche ragt. Auch wenn durch diese Wechselwirkung eine Affinitätssteigerung zu erwarten ist, ist es unwahrscheinlich dass diese den 200 fachen Affinitätsunterschied zwischen RB91 und RB49 erklären könnte. Der Großteil des Affinitätsunterschieds wird demnach auf den Austausch der Ester- anstelle der Amidfunktion zurück zu führen sein. Es ist interessant, dass RB91 mit seinem Amid gut an Thr222 bindet, während RB49 mit seinem Estercarbonylsauerstoff keine vergleichbar vorteilhafte Wechselwirkung ausbilden kann. Neben der Interaktion mit dem Liganden bildet Thr222 auch eine enge Interaktion zu Asp219 aus. Während der Katalyse besteht die Aufgabe von Thr222 in der Stabilisierung des Protonierungszustands der katalytischen Diade. Die Beobachtung, dass ein Sauerstoff unter diesen Bedingungen nicht oder nur sehr schlecht an Thr222 binden kann, weist darauf hin, dass, zumindest in diesem Bindungsmodus, das Proton an Thr222 in der Bindung zu Asp219 fixiert ist.

Es ist also sehr wahrscheinlich, dass der Affinitätssprung von RB91 auf dem Austausch der Ester- gegen die Amidfunktion zurückzuführen ist. Um diese Vermutung zu beweisen, müsste eine Verbindung synthetisiert und vermessen werden, welche wie RB49 einen Ethylrest trägt, aber anstelle der Ester- eine Amidfunktion aufweist. Damit könnte der Bindungsbeitrag des Phenylsubstituenten bestimmt werden.

Die Struktur von SH40 gebunden an Endothiapepsin weist einen dritten Bindungsmodus auf. Ein direkter Vergleich dieser Struktur mit den beiden vorhergehenden ist jedoch schwierig, da ein an mehreren Stellen modifiziertes Grundgerüst vorliegt. Insbesondere der sekundäre Stickstoff der in den Strukturen von

RB49 und RB91 die Interaktion zu der katalytischen Diade ausbildet, ist durch einen tertiären Stickstoff ersetzt. Das in diesem Falle noch ein weiterer Bindungsmodus auftritt, zeugt von der hohen Adaptionfähigkeit dieses Grundgerüsts.

#### *Die weiteren Inhibitoren dieser Serie*

Die Beobachtung, dass drei verschiedene Bindemodi gefunden wurden, erklärt, weshalb es so schwierig war eine konsistente Struktur-Wirkungs-Beziehung aufzustellen und macht eine konkrete Aussage über die Bindungsmodi der anderen Inhibitoren dieser Serie schwierig, insbesondere da auch nicht ausgeschlossen werden kann, dass bei den anderen Inhibitoren dieser Serie noch weitere Bindungsmodi auftreten. Allerdings kann der für SH40 gefundene Bindungsmodus erklären, weshalb auch RB66 eine nennenswerte Inhibition von Endothiapepsin zeigt. Die Besonderheit von RB66 war, dass es anstelle des sekundären Stickstoffs, welcher bei RB49 und RB91 die Interaktion zu der katalytischen Diade vermittelt, ein Schwefelatom aufweist. Da der Schwefel keine Interaktion zu den beiden Aspartaten ausbilden kann, sollte diese Verbindung inaktiv sein. SH40 zeigt einen alternativen Bindemodus indem die Carbonylfunktion der Amidgruppe die katalytische Diade adressiert. Dieser Bindemodus verweist auf eine Möglichkeit, wie auch Inhibitoren ohne den sekundären Stickstoff, wie z.B. RB66, an das Protein binden könnten.

#### *Endothiapepsin als Modell für die Plasmepsine*

Nachdem die Bindungsmodi von RB49 und RB91 für Endothiapepsin aufgeklärt wurden, stellt sich die Frage, inwieweit diese Bindungsmodi auf die beiden Plasmepsine übertragen werden können. Ein Vergleich der Aminosäuren in der Bindetasche zeigt zwei für den Bindungsmodus relevante Unterschiede: Sowohl in Plasmepsin II als auch in Plasmepsin IV ist das *Flap*-Aspartat (Asp81) gegen ein Serin ausgetauscht. In Plasmepsin II findet sich zusätzlich anstelle von Gly80 ein Valin in der *Flap*. Abb. 3.11 veranschaulicht die Bedeutung dieser Unterschiede für die Bindung der beiden Inhibitoren.

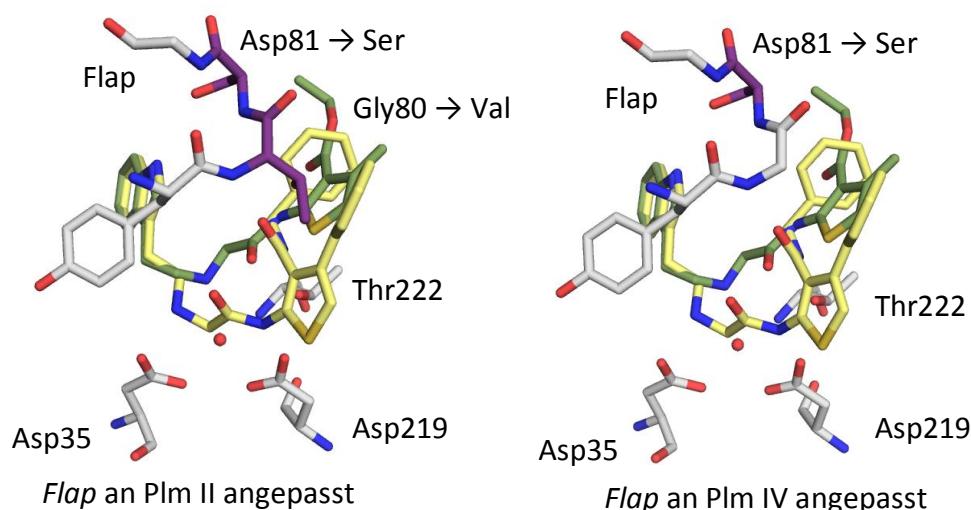


Abbildung 3.11.: Bindungsmodus von RB91 (Kohlenstoffe in gelb) und RB49 (Kohlenstoffe in grün) in Endothiapepsin. Dabei ist die *Flap*-Region einmal Plm II angepasst (statt Gly80 ein Valin sowie anstelle von Asp81 ein Serin) und einmal an Plm IV angepasst (anstelle von Asp81 ein Serin). Die veränderten Aminosäuren sind mit lila Kohlenstoffen dargestellt.

Durch den Austausch von Asp81 zu einem Serin, kann der Indolrest nicht mehr optimal in der S1-Tasche gebunden werden. Da diese Veränderung beide Plasmepsine betrifft, ist bei analogen Bindungsmodi mit einer reduzierten Affinität und/oder einer anderen *Flap*-Konformation zu rechnen.

Das Valin anstelle von Gly80 kommt bei beiden Inhibitoren den Resten in der S2-Tasche zu nahe. Die in Endothiapepsin gefundenen Bindungsmodi können somit in Plasmepsin II nur verwirklicht werden, falls die *Flap* eine zumindest leicht geöffnete Konformation einnimmt.

Aufgrund der unterschiedlichen Aminosäuren in der *Flap*-Region ist der für Endothiapepsin gefundene Bindemodus nicht direkt auf beide Plasmepsine übertragbar. Allerdings ist die *Flap* sehr flexibel, so dass eine Anpassung der *Flap*-Region an den Bindemodus durchaus möglich wäre. Insbesondere für Plasmepsin IV sind die Unterschiede so gering, dass das Vorliegen der in Endothiapepsin gefundenen Bindemodi als wahrscheinlich angenommen werden kann.

#### *Vergleich mit der anfänglichen Dockinglösung*

Das Grundgerüst dieser Inhibitoren wurde durch eine computergestützte Suche entdeckt. Ihre Synthese beruht überwiegend auf der anfänglich dargestellten Dockinglösung für Plasmepsin II. Ein Vergleich inwieweit dieser Bindungsmodus mit dem experimentell in Endothiapepsin bestimmten Bindungsmodus übereinstimmt, ist somit retrospektiv besonders interessant.

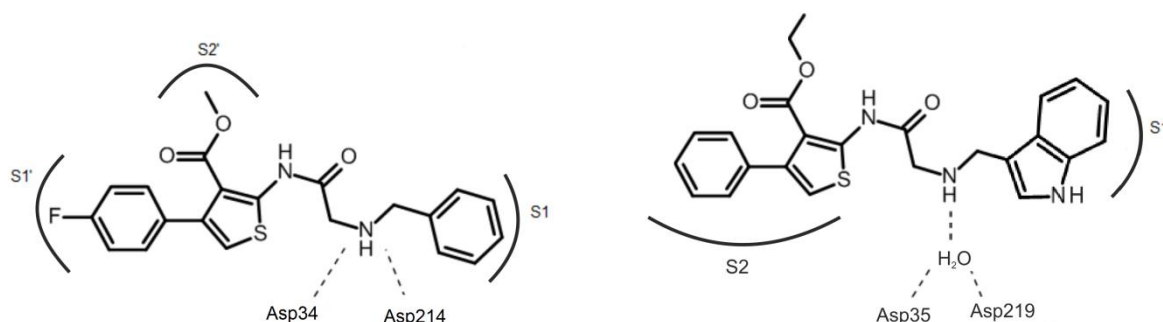


Abbildung 3.12: Die Dockinglösung auf Plasmepsin II (links) im Vergleich mit dem in Endothiapepsin experimentell bestimmten Bindungsmodus von RB49 (rechts)

Da es sich bei der für das Docking verwendeten Verbindung um einen Ester handelt, wurde der Bindungsmodus von RB49 zum Vergleich herangezogen. Abbildung 3.12 zeigt die Dockinglösung sowie den experimentell bestimmten Bindungsmodus. Der sekundäre Stickstoff wurde korrekt als die an die Aspartate bindende Gruppe vorhergesagt. Allerdings bindet der Stickstoff nicht direkt, die Interaktion wird über ein Wassermolekül vermittelt. Der Rest, der hier auf der rechten Seite dargestellt ist, wurde vom Dockingprogramm korrekt in die S1-Tasche platziert. Abweichungen ergeben sich in der Positionierung des restlichen Liganden. Während eine Orientierung hin zur S1'/S2'-Seite des Proteins vorhergesagt wurde, beobachtet man in Endothiapepsin eine Orientierung in die entgegengesetzte Richtung.

Der vorhergesagte Bindungsmodus deckt sich demnach nur teilweise mit dem experimentell bestimmten. Wie im letzten Abschnitt diskutiert, ist der in Endothiapepsin beobachtete Bindemodus auf Plasmepsin II nur mit zumindest leicht geöffneter *Flap* übertragbar. Die ausreichende Berücksichtigung der Proteinflexibilität stellt beim Docking eine große Herausforderung dar. Dies kann ein Grund sein, weshalb eine solche Lösung nicht gefunden wurde. Aufgrund der Unterschiede zwischen Plasmepsin II und Endothiapepsin kann allerdings auch nicht ausgeschlossen werden, dass in Plasmepsin II ein anderer Bindungsmodus als der experimentell beobachtete.

#### *Die Flexibilität des katalytischen Wassers*

Besonders interessant ist, dass in jedem der drei Fälle die katalytische Diade auf einem anderen Weg adressiert wird. Abb. 3.13 zeigt die drei Möglichkeiten im Vergleich.

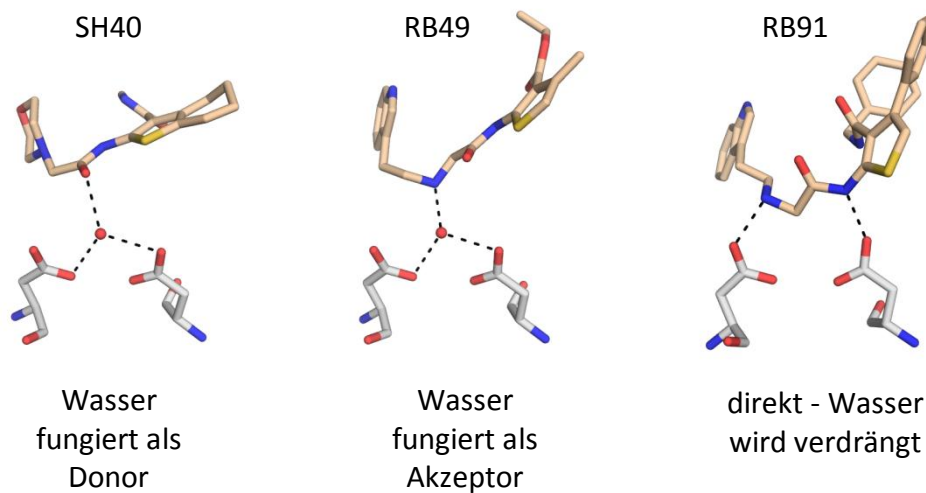


Abbildung 3.13: Die drei unterschiedlichen Wege die katalytische Diade zu adressieren. Links: Bindungsmodus von SH40. Das katalytische Wasser fungiert als Protonen-Donor. Mitte: Bindungsmodus von RB49. Das katalytische Wasser fungiert als Protonen Akzeptor. Rechts: Bindungsmodus von RB91. Die beiden Aspartate werden direkt adressiert wobei das katalytische Wasser verdrängt wird

Das katalytische Wasser nimmt in den drei Strukturen drei verschiedene Rollen ein. Im Bindungsmodus von SH40 fungiert es als Protonen-Donor. RB49 nutzt das gleich positionierte Wasser als Akzeptor. RB91 verdrängt dagegen das katalytische Wasser und bindet direkt an die beiden Aspartate.

Soweit bekannt, ist die hier vorgestellte Struktur von SH40 im Komplex mit Endothiapepsin die erste in der anhand des Bindungsmodus eindeutig ein Protonen Akzeptor an das katalytische Wasser bindet.

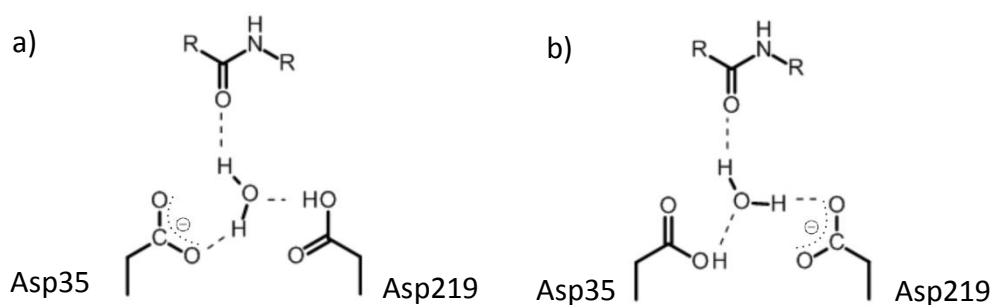


Abbildung. 3.14: Unter der Annahme, dass ein Aspartat protoniert und eins deprotoniert ist, ergeben sich anhand der Koordinaten zwei mögliche Orientierungen des Wassers.

Anhand der Koordinaten ist durch die Abstände sowie der Geometrie ersichtlich, dass das Wasser den inneren Sauerstoff von Asp35 sowie den äußeren Sauerstoff von Asp219 adressiert. Für Aspartylproteasen wird angenommen, dass zu Beginn der Peptidspaltung bzw. in unkomplexierter Form ein Aspartat protoniert sowie ein

Aspartat deprotoniert vorliegt.<sup>[65]</sup> Unter diesen Voraussetzungen ergeben sich genau zwei Möglichkeiten zur Orientierung des katalytischen Wassermoleküls (Abb. 3.14). In mit Neutronenstreuung aufgeklärten Komplexen adressieren Hydroxylgruppen die beiden Aspartate analog Variante a.<sup>[93]</sup> Die Protonierung der katalytischen Aspartate in Variante b entspricht der Situation, die von Veerapandian et al. für den unkomplexierten Zustand postuliert wurde.<sup>[64]</sup> Welche der beiden Varianten vorliegt kann ohne weitere Untersuchungen nicht zweifelsfrei entschieden werden. Bei den beiden anderen Strukturen ist die Zuweisung der exakten Position der Protonen ungleich schwerer, so dass hier lediglich spekuliert werden kann. Für die Komplexstruktur mit RB49 ist ebenfalls eine monoprotonierte katalytische Diade wahrscheinlich, wobei ein freies Elektronenpaar des Wassers der NH-Funktion des Liganden zugewandt ist. In der Komplexstruktur mit RB91 werden beide Aspartate durch je einen Wasserstoffbrücken Donor adressiert. Daher ist es denkbar, dass hier die katalytische Diade vollständig deprotoniert vorliegt. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass der basische Stickstoff in der Kette vermutlich doppelt protoniert und somit geladen vorliegt. Geladene Gruppen können auf kurze Distanz zu deutlichen  $pK_a$ -Verschiebungen führen, so dass Asp35 hierdurch einen deutlich acideren Charakter erhalten würde. Um dies zu überprüfen, sind allerdings weitergehende Untersuchungen notwendig.

### 3.1.5 Zusammenfassung

Insgesamt wurden drei Kristallstrukturen mit strukturell verwandten Liganden aus der Gewalddreaktion erhalten. Auf diese Weise konnte ihr Bindungsmodus in Endothiapepsin erfolgreich bestimmt werden.

Die drei erhaltenen Kristallstrukturen erklären zum Großteil das Verhalten der Liganden. Ein Vergleich der Bindemodi von RB91 und RB49 kann verdeutlichen, warum RB91 200 fach affiner ist als die anderen Inhibitoren dieser Serie. RB91 weist einen anderen Bindungsmodus auf, der höchstwahrscheinlich auf dem Austausch einer Ester- gegen eine Amidfunktion beruht. Der Bindemodus von SH40 bindet mit der Carbonylgruppe einer Amidfunktion an die katalytische Diade. Dieser Bindemodus bietet eine Erklärung, weshalb die Verbindungen, welche anstelle des sekundären Stickstoffs ein Schwefelatom aufweisen, ebenfalls binden können.

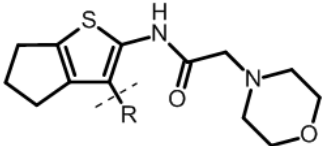
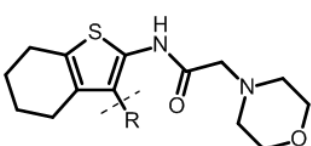
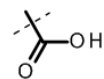
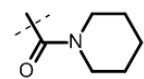
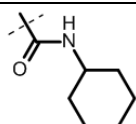
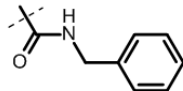
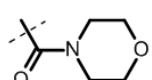
RB91 ist ein interessantes Beispiel, wie kleine Veränderungen der chemischen Struktur eines Liganden große Veränderungen bezüglich des Bindemodus hervorrufen können. Somit kann auch mit Kenntnis des Bindungsmodus einer strukturell nahe verwandten Verbindung nicht zweifelsfrei auf den Bindungsmodus eines Liganden geschlossen werden. Diese Beobachtung unterstreicht die Bedeutung der Kristallographie, denn

ohne genaue Kenntnis des exakten Bindungsmodus ist die Optimierung einer Verbindung ungleich schwerer.

Interessant ist auch, dass in jeder der drei bestimmten Kristallstrukturen das katalytische Wasser eine andere Rolle einnimmt. Bei der Bindung des Liganden dient es einmal als Protonen Donor, einmal als Protonen Akzeptor und einmal wird es verdrängt indem der Ligand direkt an die beiden Aspartate bindet. Diese Strukturen zeigen damit eindrucksvoll die große Vielseitigkeit dieses Wassermoleküls als Bindungspartner.

### 3.1.6 Anhang - Affinitäten gegen Pepsin

Alle Verbindungen die von Amir Shahim synthetisiert wurden, ließen sich zusätzlich noch gegen Pepsin vermessen. Pepsin (vom Schwein) wurde als Pulver von Sigma Aldrich bezogen. Als Puffer wurde ein 0.1 M Citrat-Puffer pH 3.5 verwendet. Die finale Proteinkonzentration betrug 8 nM. Alles andere (incl. Substrat) wurde analog dem Assay für Endothiapepsin durchgeführt. Für alle Verbindungen wurde der  $IC_{50}$  bestimmt. Das Ergebnis ist in Tabelle 3.6 dargestellt.

Grundgerüst				
Substituent	ID	$IC_{50}$ gegen Pepsin	ID	$IC_{50}$ gegen Pepsin
	AM6	47 $\mu$ M	SH28	--
	AM7	~ 250 $\mu$ M	SH36	50 $\mu$ M
	AM8	--	SH37	~ 250 $\mu$ M
	AM11	--	SH40	~ 250 - 300 $\mu$ M
	AM15	~ 200 $\mu$ M	SH39	~ 500 $\mu$ M

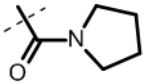
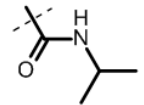
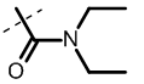
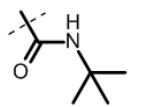
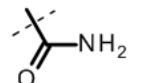
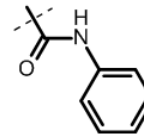
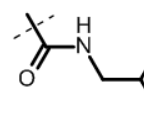
	AM16	> 500 $\mu\text{M}$	SH33	~ 250 $\mu\text{M}$
	AM18	80 $\mu\text{M}$	SH43	~ 200 $\mu\text{M}$
	AM20	> 500 $\mu\text{M}$	SH38	250 -300 $\mu\text{M}$
	AM21	--	SH41	~ 250 $\mu\text{M}$
	AM22	132 $\mu\text{M}$	SH42	~ 250 $\mu\text{M}$
	AM23	45 $\mu\text{M}$	SH25	~ 200 $\mu\text{M}$
	AM19	64 $\mu\text{M}$	SH44	~ 250 $\mu\text{M}$

Tabelle. 3.6:  $\text{IC}_{50}$  Werte bestimmt gegen Pepsin. -- = nicht bestimmbar aufgrund zu geringer Löslichkeit

Die Verbindungen mit einem sechsgliedrigem Ringsystem am Thiophenring sind schlechter in der Affinität als die Verbindungen mit einem fünfgliedrigem Ringsystem an dieser Stelle. Die einzig signifikante Ausnahme bildet SH36. Dies ist besonders interessant, da bei Endothiapepsin keine Präferenz für ein Grundgerüst festgestellt werden konnte. Abbildung 3.15 zeigt eine Überlagerung der mit Endothiapepsin gewonnen Struktur mit Pepsin.



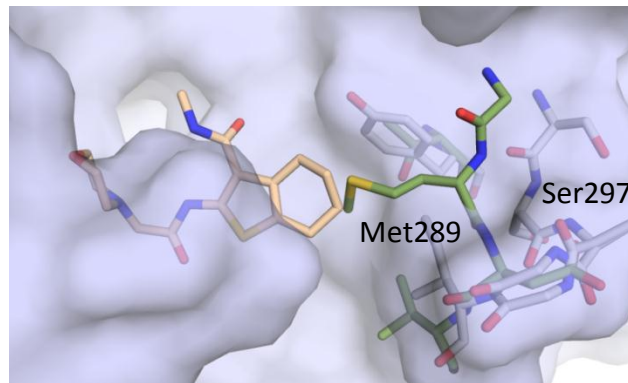


Abbildung 3.15: Die S2-Tasche von Endothiapepsin und Pepsin im Vergleich. Die Kohlenstoffatome des Liganden sind in beige dargestellt, die von Endothiapepsin in weiß und solche von Pepsin in grün. Die Oberfläche von Endothiapepsin ist hellblau eingefärbt. Für die Überlagerung wurde eine Pepsin-Struktur aus der PDB verwendet (PDB-Code: 4PEP).

Die S2-Tasche der beiden Proteine unterscheidet sich deutlich. In Pepsin ragt Met289 weit in die Bindetasche hinein. In Endothiapepsin befindet sich an dieser Stelle Ser297, das in die der Bindetasche abgewandte Richtung weist. Durch Met289 ist die S2-Tasche in Pepsin, verglichen mit Endothiapepsin, deutlich kleiner. Für die Verbindungen mit einem sechsgliedrigen Ring am Thiophenring ist somit der Platz in der S2-Tasche weniger günstig, was ihre abfallende Affinität gegenüber den sterisch weniger anspruchsvollen Fünfring-Derivaten erklären kann.

## 3.2 Inhibitoren basierend auf einem Azepin-Grundgerüst:

### Mehrere Moleküle besetzen nahezu die gesamte Bindetasche

Mit Pyrrolidinen und Piperidinen sind sowohl stickstoffhaltige Fünf- wie auch Sechsringe als Aspartylprotease-Inhibitoren bekannt und deren Bindungsmodus beschrieben. Die hier vorgestellte Struktur zeigt nun erstmals den Bindemodus eines Azepin-Derivats, also eines stickstoffhaltigen Siebenrings, an die katalytische Diade einer Aspartyl-Protease. Interessanterweise finden sich neben dem an die katalytischen Aspartate gebundenen Molekül noch zwei Inhibitor-Bruchstücke in der Bindetasche so dass nahezu der gesamte Bereich der Bindetasche besetzt wird. Diese zusätzlichen Moleküle helfen die Bindetasche auszuleuchten und geben damit wertvolle Informationen für das Design weiterer Inhibitoren. Ein Vergleich mit dem zuvor vorhergesagten Bindemodus betont zudem die besondere Bedeutung der korrekten Vorhersage der Siebenringkonformation.

#### 3.2.1 Einleitung

Sekundäre Stickstoffe sind in fünf- und sechsgliedrigen Ringsystemen bereits erfolgreich als Grundgerüst für Aspartylprotease-Inhibitoren eingesetzt worden. So sind Verbindungen mit einem Pyrrolidin-Grundgerüst (Fünfringe) als potente HIV-Protease- und Plasmepsin- Inhibitoren bekannt.<sup>[94, 95]</sup> Piperidine (Sechsringe) wurden erfolgreich als Renin-Inhibitoren eingesetzt.<sup>[75]</sup> Selbst Aziridin-Derivate, also ein sekundärer Stickstoff in einem Dreiringsystem, wurden als Aspartylprotease-Inhibitoren synthetisiert.<sup>[96, 97]</sup> Somit sind die siebengliedrigen Azepine eine ebenso konsequente wie interessante Fortsetzung dieses Prinzips. Im Rahmen der Dissertationen von Torsten Luksch und Nan-Si Brass wurden Verbindungen mit einem Azepin-Grundgerüst als Plasmepsin- Inhibitoren entworfen und synthetisiert. Für Plasmepsin II und IV erlangen diese Gerüste Affinitäten bis in den dreistellig nanomolaren Bereich. Synthese, Assayergebnisse sowie Designmethoden wurden in der Veröffentlichung von *Luksch und Chan et al.* ausführlich dargestellt.<sup>[98]</sup> Abbildung 3.16 zeigt den mittels des Programms FlexX vorhergesagten Bindemodus für Plasmepsin II. Die katalytischen Aspartate werden demnach durch den Azepin-Stickstoff adressiert, während die beiden angefügten Substituenten die S2' sowie die S1-Tasche besetzen. Die beiden Carbonylsauerstoffe adressieren die *Flap*-Region indem der eine mit dem Stickstoff von Val78 und der zweite mit der Hydroxygruppe von Ser79 eine Wasserstoffbrücke eingeht. Neben dem Bindemodus für das Grundgerüst wurde auch der Bindemodus für verschieden substituierte Inhibitoren vorhergesagt. Es zeigte sich, dass die Interaktion zu Ser79 abhängig vom Substituenten in der S1-Tasche verloren geht.

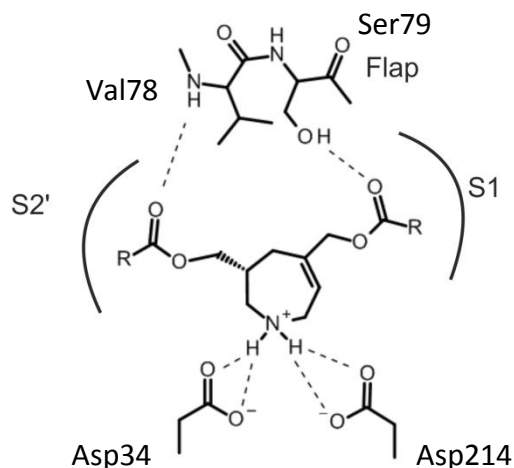


Abbildung 3.16: Der mit FlexX vorhergesagte Bindemodus des Azepin-Grundgerüsts in Plm II.

Da die beiden Carbonylgruppen die Aminosäuren der *Flap*-Region nicht optimal adressieren, wurden zusätzlich Inhibitoren mit einem verkürzten Carbonylabstand synthetisiert. Durch diesen verkürzten Abstand sollten die beiden Carbonylgruppen an derselben Position wie die Carbonylgruppen von Pepstatin zu liegen kommen und somit die *Flap* besser adressieren. In Abbildung 3.17 sind die Affinitäten zweier Inhibitoren mit kurzem und langem Abstand im Vergleich dargestellt. Leider zeigt sich kein signifikanter Unterschied.

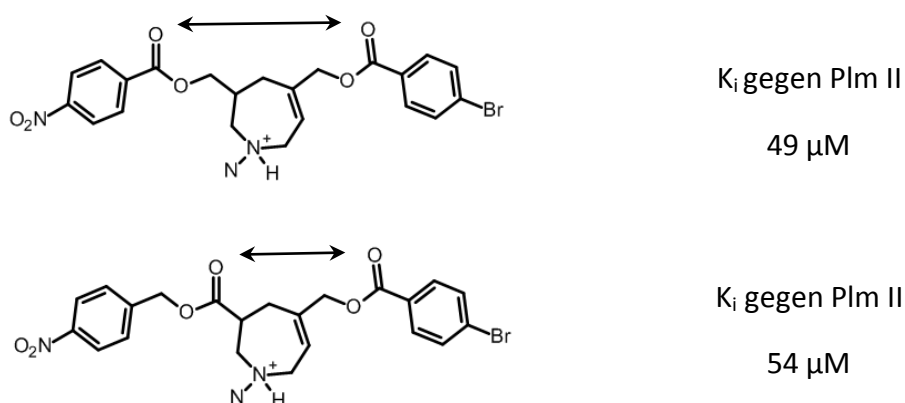


Abbildung 3.17 Inhibitoren mit kurzem und langem Carbonylabstand im Vergleich. Die Assaywerte wurden von Torsten Luksch bestimmt. Die Verbindungen wurden beim Test als Racemate eingesetzt.

Um die noch freie S1'-Tasche zu adressieren und somit die Affinität in den nanomolaren Bereich zu steigern, wurde das Grundgerüst um einen dritten Substituenten erweitert. Abbildung 3.18 zeigt die mittels des Programms FlexX von Tobias Craan vorhergesagte Taschenbesetzung eines trisubstituierten Inhibitors in Plasmepsin II. Der grundsätzliche Bindemodus ist erhalten geblieben, wobei diesmal, im Gegensatz zu den disubstituierten Inhibitoren, das S-Enantiomer die bessere

Taschenbesetzung erzielen sollte. Die katalytische Diade wird unverändert durch den Azepin-Stickstoff adressiert. Der Substituent mit dem para-Brom-Substituenten liegt in der S1-Tasche während die beiden anderen Substituenten mit jeweils einer para-Amino-Substitution die S2'- bzw. S1'-Tasche adressieren. In der S2'-Tasche bildet die Aminogruppe eine Wasserstoffbrücke zu dem Carbonylsauerstoff von Leu131. Die *Flap*-Region wird lediglich durch die Carbonylgruppe auf der Seite der Amino-Substituenten adressiert indem diese eine Interaktion mit dem Amid-Stickstoff von Val78 ausbildet. Die S2-Tasche bleibt unbesetzt und bietet damit Platz für weitere Optimierungen.

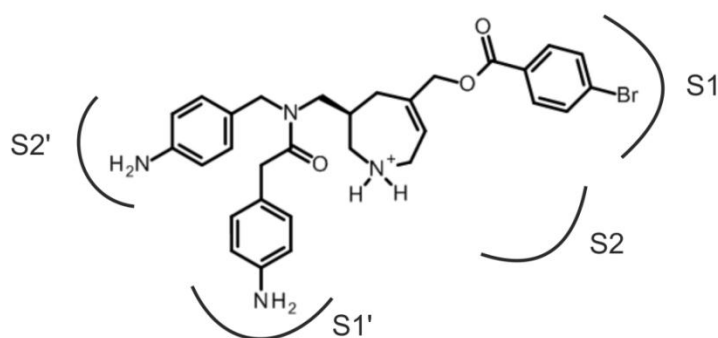


Abbildung 3.18: Durch Docking vorhergesagte Besetzung der Taschen durch einen trisubstituierten Inhibitor.

### 3.2.2 Affinitätsbestimmungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die trisubstituierten Inhibitoren gegen Plasmepsin II nach dem Protokoll von Torsten Luksch vermessen.<sup>[94]</sup> Um die Vergleichbarkeit der Assayergebnisse zu gewährleisten, wurden erfolgreich zwei bereits bekannte Werte reproduziert. Die Ergebnisse für die trisubstituierten Inhibitoren sind in Tabelle 3.4 aufgeführt. Zum Vergleich sind in Tabelle 3.6 zusätzlich zwei Assaywerte der zugehörigen disubstituierten Inhibitoren angegeben.

ID	R1	R2	Plm II K <sub>i</sub>
NC230			11.5 μM

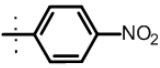

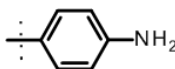
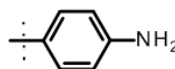
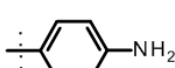

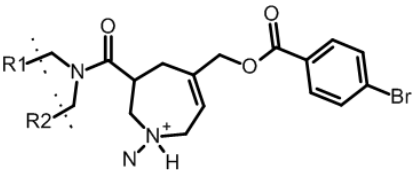
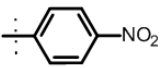
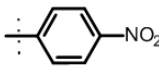
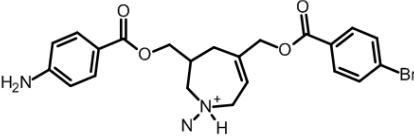
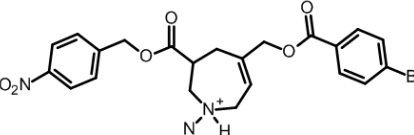
NC231			7.5 $\mu$ M
NC239			5.0 $\mu$ M
ST231			8.3 $\mu$ M
			
NC229			11.5 $\mu$ M
zum Vergleich			0.8 $\mu$ M
			54 $\mu$ M

Tabelle 3.6: Inhibitionswerte der trisubstituierten Inhibitoren auf Plasmeypsin II. Zum Vergleich sind die von Torsten Luksch gemessenen Werte der analogen disubstituierten Verbindungen mit angegeben. Alle Verbindungen liegen als Racemat vor.

Entgegen den Erwartungen konnte für die strukturell erweiterten Inhibitoren keine Affinitätssteigerung festgestellt werden. Für die meisten Verbindungen verschlechterte sich sogar die Affinität geringfügig. Lediglich der Inhibitor mit verkürztem Carbonylabstand zeigt eine, im Vergleich zu dem disubstituierten Analogon, leicht verbesserte Affinität. Der Vergleich von NC230 und NC229 zeigt, dass auch bei den trisubstituierten Inhibitoren der Carbonylabstand keinen sichtbaren Einfluss auf die Affinität nimmt. Interessant ist, dass sowohl die para-Amino- wie auch die para-Nitro-Substituenten eine Inhibition zeigen. Für den para-Amino-Substituenten wurde in der S2'-Tasche eine Interaktion mit einem Carbonylsauerstoff vorhergesagt. Da diese Interaktion für den para-Nitro-Substituenten nicht möglich ist, wurde für diese Verbindung keine oder zumindest eine deutlich verringerte Affinität erwartet.

Um den tatsächlich vorliegenden Bindemodus zu bestimmen ist eine Kristallstruktur der geeignetste Weg. Da eine Kristallisation mit Plasmepsin II nicht gelang, wurde wiederum Endothiapepsin als Modellsystem verwendet. Die trisubstituierten Inhibitoren zeigen für Endothiapepsin eine gute Inhibition (Tabelle 3.7).

<b>ID</b>	<b>% Inhibition für EP bei 100 <math>\mu</math>M</b>
NC230	86 %
NC231	85 %
NC239	97 %
ST231	87 %
NC229	67 %

Tabelle 3.7: % Inhibition der trisubstituierten Inhibitoren gegen EP bei einer Inhibitorkonzentration von 100  $\mu$ M

Der  $K_i$  wurde lediglich für NC239 bestimmt da von dieser Verbindung eine Struktur im Komplex mit Endothiapepsin erhalten werden konnte. Der  $K_i$  für NC239 gegen Endothiapepsin beträgt demnach 4.2  $\mu$ M und ist damit dem  $K_i$  gegen Plasmepsin II praktisch gleich (5.0  $\mu$ M).

### 3.2.3 Bestimmung der Kristallstruktur

Alle trisubstituierten Inhibitoren wurden zur Kokristallisation mit Endothiapepsin angesetzt. Mit der bis zu diesem Zeitpunkt verwendeten Kristallisationsbedingung konnten jedoch für den NC239-Komplex keine Kristalle erhalten werden. Für die vier anderen Inhibitoren wuchsen lediglich sehr kleine Kristalle von schlechter Qualität, die für eine Datensammlung nicht geeignet waren. Da es mit dieser Kristallisationsbedingung nicht möglich war, ausreichend streufähige Kristalle zu erhalten, wurde nach alternativen Kristallisationsbedingungen gesucht. Dazu wurden mit Hilfe eines Kristallisationsroboters (Cartesian Microsys<sup>TM</sup> SQ 4000) insgesamt 768 verschiedene Bedingungen durchgetestet. Die eingesetzte Proteinlösung enthielt 5 mg/ml Endothiapepsin versetzt mit 2 mM NC239 (in 0.1 M Acetat-Puffer pH 4.6 mit einer DMSO Endkonzentration von 2 %). In zehn Bedingungen wurden dabei Kristalle erhalten, davon wurden zwei Bedingungen erfolgreich reproduziert. Eine dieser Bedingungen konnte so optimiert werden, dass sie zuverlässig Kristalle lieferte. Die so

gewonnenen Kristalle zeigten, verglichen mit den durch die bisherige Kristallisationsbedingung erhaltenen, die gleiche Raumgruppe mit analogen Zellkonstanten. Das Protokoll der erfolgreichen Kristallisationsbedingung ist im Material und Methoden Teil beschrieben während sich die Details zu allen zehn Bedingungen im Anhang dieser Arbeit finden.

Auf diese Weise konnte mit NC239 ein Kokristall und in Folge die Struktur von NC239 im Komplex mit Endothiapepsin erhalten werden. Verschiedene andere Inhibitoren mit einem Azepin-Grundgerüst wurden ebenfalls unter dieser Bedingung mit Endothiapepsin zur Kristallisation angesetzt, lieferten allerdings lediglich Apostrukturen.

### *Endothiapepsin im Komplex mit NC239*

Von einem NC239-Endothiapepsin Kokristall konnte am SLS (Swiss Light Source) ein Datensatz mit einer Auflösung von 1.32 Å aufgenommen werden. Der Ligand ist deutlich in der resultierenden Differenzdichte zu erkennen (Abbildung 3.19). Neben dem an die beiden Aspartate gebundenen Liganden finden sich noch zwei weitere Moleküle in der Bindetasche, die durch eine hydrolytische Esterspaltung aus NC239 hervorgegangen sind. So findet sich auf der S1/S2-Seite des Proteins noch ein zweites Molekül des Inhibitors, wobei hier in der Dichte die Seitenkette mit dem Brom-Substituenten fehlt. Insgesamt ist die Dichte dieses zweiten Moleküls etwas schlechter definiert als die des an die Aspartate bindenden Moleküls. Des Weiteren befindet sich noch ein Molekül para-Brom-Benzoesäure in der Bindetasche, welches im Gegensatz zu den anderen Liganden lediglich eine Besetzung von 83 % aufweist.

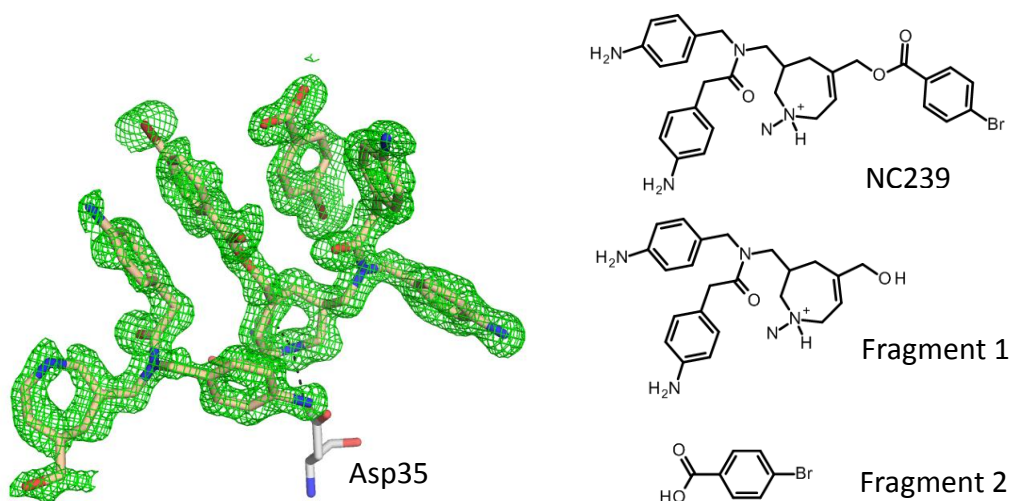


Abbildung 3.19: Links ist in grün die Differenzdichte  $mF_o - DF_c$  aller sich in der Bindetasche befindender Moleküle bei  $2.0 \sigma$  wiedergegeben. Von den beiden katalytischen Aspartaten ist lediglich Asp35 auf dem Bild zu erkennen, Asp219 befindet sich hinter dem Azepin-Ring. Rechts sind die dazugehörigen Strukturformeln dargestellt.

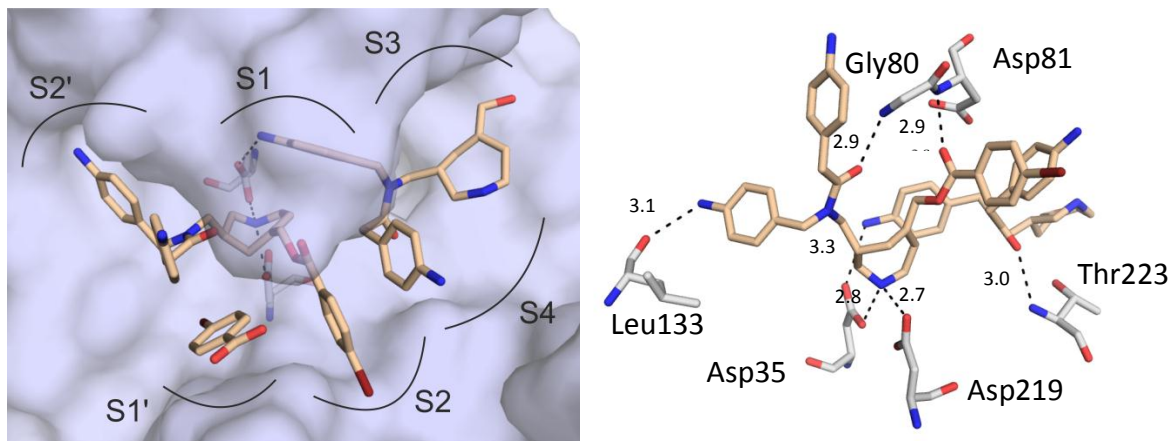


Abbildung 3.20: Links: Überblick über alle Liganden in der Bindetasche Rechts: Detaillierter Bindemodus der beiden großen Liganden. Die Abstände der Wasserstoffbrücken sind in Å angegeben

Abbildung 3.20 zeigt den Bindemodus der Liganden in der Bindetasche. Nahezu der gesamte Bereich der Bindetasche ist besetzt.

Der vollständig sichtbare Inhibitor adressiert die katalytische Diade mit dem Azepin-Stickstoff. Durch die zentrale Position zwischen den beiden Aspartaten bildet er zu jedem eine Wasserstoffbrücke. Der Substituent mit dem para-Brom-Benzyl-Rest ragt in die S2-Tasche. Einer der Substituenten mit einem para-Amino-Benzyl-Rest adressiert die S2'-Tasche, wobei die Aminogruppe mit dem Carbonyl-Sauerstoff von Leu133 interagiert. Der dritte Substituent zeigt an der *Flap* vorbei ins umgebende Solvent. Die beiden Carbonylgruppen des Liganden bilden eine Wasserstoffbrücke mit den Amid-Stickstoffen von Gly80 und Asp81 der *Flap*-Region.

Das zweite, hydrolytisch verkürzte Molekül adressiert ebenfalls eines der katalytischen Aspartate. Die Aminogruppe eines para-Amino-Benzyl-Substituenten besetzt die S1-Tasche und bildet eine Wasserstoffbrücke zu Asp35 aus. Mit 3.3 Å fällt diese allerdings sehr lang aus. Der zweite Substituent zeigt in Richtung der S4-Tasche und adressiert mit seiner Carbonylgruppe den Amid-Stickstoff von Thr223. Der Azepin-Ring liegt in dem Bindetaschenbereich vor der S3-Tasche und bildet keine polaren Interaktionen zum Protein. Die endständige Hydroxygruppe ist in der Dichte nur schlecht definiert und demnach wahrscheinlich konformativ ungeordnet.

Die para-Brom-Benzylsäure besetzt die S1'-Tasche ohne eine polare Interaktion mit dem Protein einzugehen. Da die Dichte nicht klar umrissen ist, wurde zur sicheren Identifizierung dieses Moleküls das anomale Signal des Broms herangezogen. In der anomalen Dichtekarte ist das Signal der beiden Brom-Atome deutlich zu sehen (Abbildung 3.21). Die beiden Bromatome sind lediglich zu 39 % und 45 % besetzt und somit teilweise abgespalten. Eine solche Abspaltung durch die hochenergetische Röntgenstrahlung während der Datensammlung wurde bereits in der Literatur



beschrieben.<sup>[99]</sup> Diese Verknüpfung ist besonders anfällig, da die verwendete Wellenlänge energetisch im Bereich der Brom-Absorptionskante liegt.

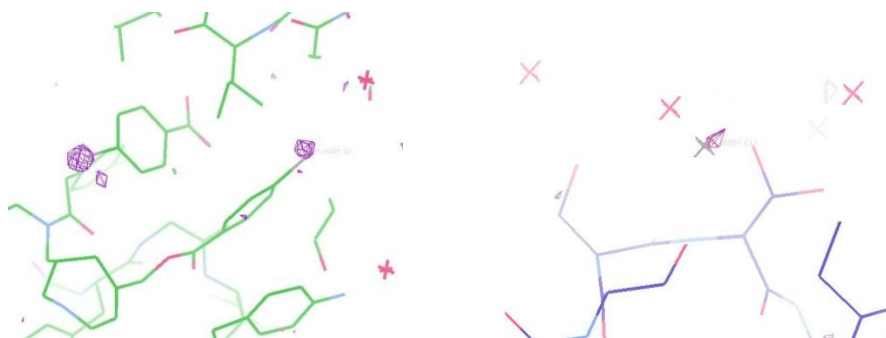


Abbildung 3.21: In der Bindetasche sind zwei anomale Dichtepunkte zu erkennen, deren Position gut mit den beiden Bromatomen der Liganden übereinstimmt (linkes Bild). Zwischen den beiden symmetrieäquivalenten Proteinmolekülen konnte ebenfalls ein anomales Signal beobachtet werden (rechtes Bild). Für diese Stelle wurde ein Chloratom zugewiesen. Die anomalen Dichtekarten wurden mit phenix.refine<sup>[100]</sup> mit einem Modell ohne Inhibitor und Chlor berechnet. Beide Bilder zeigen das Gleiche: sigma-Level der anomalen Karte (in lila) und wurden mit COOT<sup>[101]</sup> erstellt. Auf dem linken Bild sind Kohlenstoffatome grün, auf dem rechten in blau dargestellt. Sauerstoffe sind in beiden Fällen rot, Stickstoffe dunkelblau, andere Atome grau eingefärbt.

Zusätzlich zu den beiden Bromatomen in der Bindetasche wurde an einer Position zwischen zwei symmetrieäquivalenten Proteinmolekülen ein weiterer anomaler Streuer beobachtet. Dieser Stelle wurde ein Chlorid zugewiesen. Des Weiteren befinden sich außerhalb der Bindetasche noch ein DMSO, ein Glycerol und ein Sulfat-Ion. Diese Teilchen sind ebenso wie das Chlorid-Ion Bestandteile der Kristallisationsbedingung. Das Sulfat-Ion befindet sich in zwei Konformationen (zu 46 und 54 % besetzt) im Solvens-Bereich zwischen zwei benachbarten symmetrie-äquivalenten Proteinen. Jedes dieser Sulfat-Ionen bildet Wechselwirkungen über Wassermoleküle zu dem Protein aus. Eins dieser Wassermoleküle tritt lediglich zusammen mit einem der beiden Sulfat-Ionen auf und wurde in seiner Besetzung an dieses Sulfat-Ion gekoppelt.

Die Struktur von Endothiapepsin im Komplex mit NC239 wurde in der Proteindatenbank unter dem Code 3T6I hinterlegt. Die kristallographischen Details zu dieser Struktur sind in Tabelle 3.7 aufgelistet.

*Kristallographische Tabelle*

Inhibitor	<b>NC239</b>
PDB Code	3T6I
<b>Datensammlung und Prozessierung</b>	
Sammlungsort	SLS
$\lambda$ [Å]	1.000
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>
Einheitszellkonstanten	
a [Å]	45.4
b [Å]	73.4
c [Å]	53.3
$\beta$ [°]	110.0
Auflösung [Å]	1.32
Höchste Auflösungsschale [Å]	1.34 – 1.32
Anzahl einzelner Reflexe	75322
R <sub>sym</sub> [%] <sup>a</sup>	5.2 (30.5)
Vollständigkeit [%] <sup>a</sup>	97.7 (80.4)
Redundanz <sup>a</sup>	3.5 (2.0)
I/ $\sigma$ <sup>a</sup>	26.0 (2.8)
<b>Verfeinerung</b>	
Verwendetes Program	Phenix
Anisotrop verfeinert	Ja
Letzter R <sub>free</sub> <sup>b</sup>	14.8
Letzter R <sub>work</sub> <sup>b</sup>	13.0
Anzahl Wassermoleküle	372
Ramachandran Diagramm	
Bevorzugte Regionen (%)	94.6
Erlaubte Regionen (%)	5.4
Erweiterte erlaubte Regionen (%)	0
Verbotene Regionen (%)	0
Durchschnittliche B-Werte (Å <sup>2</sup> )	
Protein Atome	10.9
Wasser Moleküle	26.7
Inhibitoren	20.1
Andere Liganden <sup>c</sup>	17.0
RMSD Bindungslängen [Å]	0.005
RMSD Bindungswinkel [°]	1.083
<sup>a</sup> Wert in Klammern bezieht sich auf die höchste Auflösungsschale	
<sup>b</sup> die angegebenen R-Werte beziehen sich jeweils auf die gesamten Daten	
<sup>c</sup> andere Liganden sind Glycerol, DMSO, Sulfat und Chlorid	

Tabelle 3.7: Kristallographische Tabelle

## 3.2.4 Diskussion

Die hier vorgestellte Komplexstruktur bietet die Möglichkeit den Bindemodus von Inhibitoren basierend auf einem Azepin-Grundgerüst besser zu verstehen. Neben

einem Vergleich des experimentell auf Endothiapepsin bestimmten mit dem vorhergesagten Bindemodus ist auch eine Betrachtung der zusätzlich in der Bindetasche gefunden Bruchstücke von besonderem Interesse. Diese zusätzlichen Moleküle bieten interessante Hinweise auf bevorzugte Interaktionen und können so einen Beitrag zum weiteren Inhibitor-Design liefern

### *Der Bindemodus von NC239*

Im Folgenden soll der Bindemodus des vollständigen Moleküls NC239 für sich alleine betrachtet und mit der anfänglichen Dockinglösung von Plasmepsin II verglichen werden. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, dass es nicht ausgeschlossen werden kann, dass die zusätzlichen Bruchstücke den Bindemodus mit beeinflussen.

Der einzige für den Bindemodus relevante Unterschied zwischen Plasmepsin II und Endothiapepsin ist der in Kapitel 3.1 schon erwähnte Austausch von Val78 (Plm II) zu Gly80 (EP) in der *Flap*-Region. Das sterisch anspruchsvollere Valin würde dem Phenylring des dem Solvent zugewandten Substituenten recht nahe kommen (Abbildung 3.22). Durch eine leichte Drehung dieses Phenylrings kann der Inhibitor sich allerdings den nötigen Abstand verschaffen. Somit ist der in Endothiapepsin gefundene Bindemodus prinzipiell auf Plasmepsin II übertragbar.

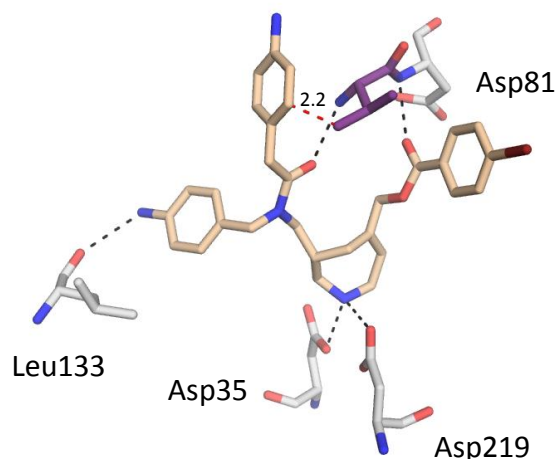


Abbildung 3.22: Bindemodus von NC239 in Endothiapepsin. Gly80 ist auf diesem Bild, zu einem Valin (Kohlenstoffatome in lila) mutiert um die Verhältnisse in Plasmepsin II darzustellen. Als rote gestrichelte Linie ist der Abstand dieses Valin zu dem nächsten Kohlenstoffatom von NC239 eingezeichnet. Die Entsprechende Länge ist in Å angegeben. Die schwarz gestrichelten Linien zeigen die Interaktionen des Inhibitors mit dem Protein.

Vergleicht man diesen Bindemodus mit der in Abb. 3.16 dargestellten Dockinglösung von Plasmepsin II so zeigt sich, dass der Azepin-Stickstoff wie vorhergesagt die beiden Aspartate adressiert. Auch die grobe Orientierung des Liganden in der Bindetasche

wurde korrekt vorhergesagt. So zeigt die Seite mit den beiden Substituenten auf die S1'/S2'-Seite des Proteins, während der Rest mit dem para-Brom-Phenyl-Substituenten die S1/S2-Seite adressiert. Auch die Interaktion in der S2'-Tasche wurde durch das Docking angegeben. Die Aminogruppe des zusätzliche Substituenten (ohne die Carbonyl-gruppe) adressiert, wie vermutet, die Carbonylgruppe von Leu133 (in Plasmepsin II Leu131). Die Besetzung der anderen Taschen weicht hingegen ab. Der zweite Substituent auf dieser Seite ragt nicht wie erhofft in die S1-Tasche sondern zeigt an der *Flap* vorbei ins umgebende Solvent. Der letzte, über eine Estergruppe angeknüpfte, Substituent besetzt die S2-Tasche anstelle der vorhergesagten S1-Tasche. Der Carbonylsauerstoff der Amid-bindung im Liganden bildet wie erhofft eine Wasserstoffbrücke zu dem Rückgrat-Stickstoff von Gly80 (Val78 in Plasmepsin II). Die zweite Carbonylgruppe des Liganden adressiert ebenfalls die *Flap*, obwohl im Docking kein Interaktionspartner vorhergesagt wurde. Im Docking wurde das S-Enantiomer bevorzugt während in der Kristallstruktur eindeutig das R-Enantiomer gefunden wurde.

Interessanterweise weicht auch die Konformation des zentralen Siebenrings von der Vorhersage ab. Die Konformation die während des Docking verwendet wurde, ist mit Hilfe des Programms Corina<sup>[102]</sup> erzeugt worden und orientiert sich an einer Kleinmolekülstruktur aus der Cambridge Structural Database.<sup>[103, 104]</sup> Diese Ringkonformation wurde während dem Docking sowohl für das R-wie auch die S-Enantiomer verwendet. Abbildung 3.23 zeigt die verschiedenen Konformationen des Siebenrings im Vergleich. In allen Fällen findet sich eine Boot-Konformation, wobei diese in der hier vorgestellten Komplexstruktur im Vergleich zu der Dockinglösung invertiert ist. Da die richtige Vorhersage der Ringkonformation entscheidend für die Orientierung der Substituenten ist, liegt hier ein möglicher Grund für die Abweichungen der Dockinglösung.

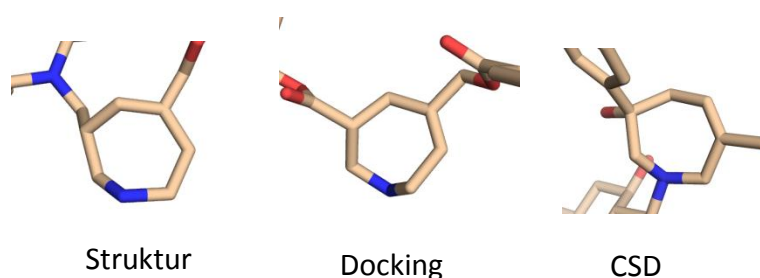


Abbildung 3.23 Verschiedene Konformationen des Siebenrings. Links: in der Komplexstruktur von Endothiapepsin mit NC239, Mitte: Energieminimierte Form generiert von Corina, Rechts: Kleinmolekülstruktur aus der CSD (Cambridge Structural Database)

Somit zeigt der in Endothiapepsin gefundene Bindemodus trotz einiger Übereinstimmungen doch relevante Unterschiede zu dem postulierten Bindemodus. Insbesondere die Taschenbesetzung stimmt nicht überein. Einer der drei Reste zeigt

ins umgebende Solvent. Dies ist wahrscheinlich der Grund, weshalb die Einführung eines dritten Substituenten keine Verbesserung der Affinität gebracht hat.

#### *Die weiteren Inhibitoren mit einem Azepin-Grundgerüst*

Es stellt sich die Frage inwieweit der Bindemodus von NC239 auf andere Inhibitoren dieser Serie übertragen werden kann. Bei diesem Bindemodus ist anzunehmen, dass bei Austausch des para- Amino-Benzyl-Substituenten des ins Solvent zeigenden Substituenten zu einem rein hydrophoben Substituenten die Affinität abnimmt. Dies kann in den Affinitäten nicht beobachtet werden. Auch bei Austausch des para-Amino-Benzyl-Substituenten in der S2'-Tasche durch einen para-Nitro-Benzyl-Rest ist durch Verlust der Wasserstoffbrückenbindung eine verringerte Affinität zu erwarten. Auch dies kann durch die Assaydaten nicht bestätigt werden. Aufgrund dieser Hinweise lässt sich spekulieren, dass auch andere Bindungsmodi möglich sind. Auch die Tatsache, dass es nicht gelungen ist eine Kristallstruktur von Endothiapepsin im Komplex mit einem anderen Inhibitor dieser Serie zu erhalten, ist ein denkbarer Hinweis dafür, dass sich die Verbindungen unterschiedlich verhalten. Ohne weitere Untersuchungen lässt sich demnach der Bindemodus von NC239 nicht zweifelsfrei auf die anderen Verbindungen übertragen.

#### *Die zusätzlichen Moleküle in der Bindetasche*

Neben einem in der Differenzdichte vollständig definierten Molekül NC239 sind in der Bindetasche noch zwei Bruchstücke desselben zu erkennen. Die Qualität der Dichte des größeren Fragments nimmt dabei in Richtung der vermuteten Spaltstelle deutlich ab. So sind die beiden para-Amino-Benzyl-Reste in der Dichte gut definiert während der Azepin-Ring schon eine deutlich schlechtere Dichte aufweist. Die endständige Hydroxylgruppe schließlich ist nur undeutlich zu erkennen. Aufgrund dessen kann nicht mit völliger Sicherheit ausgeschlossen werden, dass der in der Dichte fehlende Substituent tatsächlich hydrolytisch abgespalten wurde, sondern aufgrund seiner starken Restmobilität in der Kristallstruktur nicht identifizierbar ist. Dasselbe gilt für das zweite, kleinere Fragment. Da die Bruchstelle einer Esterspaltung entspricht, ist es allerdings wahrscheinlich, dass der Inhibitor an dieser Bindung gespalten wurde. Die Bruchstücke können als Verunreinigung aus der Synthese stammen oder der Ligand wurde nachträglich während der Kristallisation (bei pH 4.6) gespalten. Zur Überprüfung, ob der Inhibitor unter den Kristallisationsbedingungen stabil ist, wurde von Frank Sielaff eine HPLC Untersuchung durchgeführt. Es wurde zum einen die Inhibitor Lösung direkt analysiert und zum anderen eine Probe, die für neun Tage bei Raumtemperatur in dem Kristallisationspuffer aufbewahrt wurde. Hier konnte keine

Zersetzung beobachtet werden, wobei die Reinheit der Verbindung in beiden Fällen mehr als 97 % betrug. Somit lässt sich zumindest ausschließen, dass NC239 über die Zeit von neun Tagen im Kristallisationspuffer hydrolysiert.

Durch die zusätzlichen Moleküle in der Bindetasche ist diese nahezu vollständig besetzt. Dies bietet die Möglichkeit bevorzugte Interaktionspunkte zu erkennen und später im Inhibitor-Design zu berücksichtigen. So legt der hydrophobe Teil der para-Brom-Benzoesäure in der S1'-Tasche einen hydrophoben Substituenten zur Adressierung dieser Tasche nahe. Der Substituent welcher in der Kristallstruktur in das umgebende Lösungsmittel zeigt, kann möglicherweise durch einen geeigneten hydrophoben Substituenten, wie geplant, die S1'-Tasche besetzen. ST231, das an dieser Stelle lediglich einen unsubstituierten Benzylring aufweist, zeigt ebenfalls keine verbesserte Affinität und der gleiche Bindemodus ist anzunehmen. Durch einen an dieser Stelle optimierten Rest, der durch Vergrößerung der Brücke zwischen Amidbindung und Phenylrest die S1'-Tasche adressiert, ist möglicherweise eine Affinitätssteigerung denkbar. Die S4-Tasche wird in der Kristallstruktur von einem para-Amino-Substituenten des zweiten Moleküls besetzt. Diese Beobachtung kann dazu genutzt werden einen vierten Substituenten zu entwerfen, der diese Tasche entsprechend adressiert.

### 3.2.5 Zusammenfassung

Es konnte die Kristallstruktur von einem Inhibitor mit einem trisubstituierten Azepin-Grundgerüst in Endothiapepsin erhalten werden. Zusätzlich zu einem vollständigen, an die katalytischen Aspartate gebundenen, Inhibitormolekül finden sich noch zwei Inhibitorbruchstücke in der Bindetasche. In erster Näherung wurde der Bindemodus durch das Program FlexX richtig vorhergesagt, relevante Unterschiede finden sich vor allem in der Taschenbesetzung. Zudem nimmt der Siebenring eine andere als die vermutete Konformation ein was eine korrekte Vorhersage durch das Dockingprogram nahezu unmöglich machte. Diese Beobachtung unterstreicht wie wichtig es ist die Flexibilität von Ringsystemen, welche von den verschiedenen Dockingprogrammen nur unzureichend berücksichtigt wird, zu beachten. In dem experimentell bestimmten Bindemodus zeigt der Substituent, der die S1'-Tasche adressieren sollte, ins Solvent. Dadurch erklärt sich, warum die trisubstituierten Inhibitoren gegenüber den doppelt substituierten keinen Affinitätsgewinn zeigen. Die Assaydaten der restlichen Inhibitoren dieser Serie lassen sich mit Hilfe des gefundenen Bindemodus nicht völlig schlüssig erklären.

Die hier vorgestellte Struktur von Endothiapepsin im Komplex mit NC239 stellt damit den ersten Schritt zu einem besseren Verständnis des Bindeverhaltens der auf einem Azepin-Grundgerüst basierenden Inhibitoren dar. Um ein vollständiges Bild zu

erhalten, insbesondere hinsichtlich der Frage, ob noch weitere Bindemodi existieren, sind allerdings noch weitere Kristallstrukturen von verschiedenen substituierten Inhibitoren notwendig. Unabhängig davon bietet die Kenntnis des Bindemodus von NC239 die Möglichkeit, diesen Inhibitor gezielt zu optimieren und auf diesem Weg einen Inhibitor mit einer gesteigerten Affinität zu erhalten. Dabei können insbesondere die zusätzlich in der Bindetasche gefundenen Bruchstücke genutzt werden, um bevorzugte Interaktionen in den unbesetzten Taschen zu identifizieren und damit als Grundlage für das Design neuer Inhibitoren zu dienen.

Alle hier vorgestellten Inhibitoren lagen als Racemate vor. Eine stereoselektive Synthese stellte sich angesichts der Tatsache, dass das bevorzugte Enantiomer nicht bekannt war als zu aufwendig dar. Durch die Kenntnis der in der Kristallstruktur von NC239 im Komplex mit Endothiapepsin gefundenen Stereochemie bietet sich jetzt die Möglichkeit, gezielt das bevorzugte Enantiomer zu synthetisieren.

### 3.3 Inhibitoren basierend auf einem Pyrrolidin Grundgerüst:

#### Die offene *Flap* von Endothiapepsin sowie Einblicke in die Protonierung der katalytischen Diade

Die hier beschriebene Komplexstruktur ist die erste in der PDB verfügbare Kristallstruktur von Endothiapepsin mit einer geöffneten (wenn auch ungeordneten) *Flap*-Region und zeigt erstmals die teilweise geöffnete, nicht von einem Liganden besetzte, *Flap*-Tasche einer pepsinähnlichen Aspartylprotease. Zudem wurde mit Hilfe der Isothermen Titrationskalorimetrie eine vollständig deprotonierte katalytische Diade nachgewiesen. Damit liefert die hier vorgestellte Komplexstruktur wertvolle Erkenntnisse, die zu einem besseren Verständnis der Flexibilität von Endothiapepsin im speziellen, aber auch der Familie der pepsinähnlichen Aspartylproteasen im Allgemeinen beitragen.

#### 3.3.1 Einleitung

Die Inhibitoren mit einem Pyrrolidin-Grundgerüst wurden für die HIV-Protease synthetisiert und dort ausführlich untersucht. Anhand von Endothiapepsin sollte nun der Bindemodus mit den pepsinähnlichen Aspartylproteasen, insbesondere Plasmepsin II, untersucht werden. Im Rahmen ihrer Dissertationen wurden diese Inhibitoren von Andreas Blum synthetisiert und von Jark Böttcher in der HIV-Protease kristallisiert und charakterisiert.<sup>[95, 105, 106]</sup> Im Sinne eines strukturbasierten Designs konnten vierfach substituierte Inhibitoren mit diesem Grundgerüst erfolgreich bis hin zu einer Affinität im zweistellig nanomolaren Bereich optimiert werden. Der Bindemodus einer dieser Inhibitoren ist in Abbildung 3.24 dargestellt. Der Pyrrolidin-Stickstoff adressiert die beiden katalytischen Aspartate während die vier Substituenten die S1'-, S2-, S2'- und S1-Tasche besetzen. Eine der Sulfonamidgruppen bildet zwei Wasserstoffbrücken zur *Flap*-Region aus.<sup>[95]</sup>

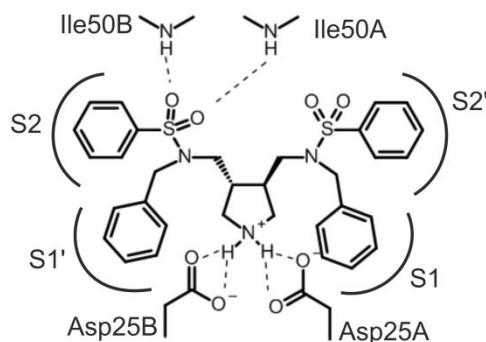


Abbildung 3.24: Bindemodus eines vierfach substituierten Pyrrolidins in der HIV-Protease. Die Graphik ist der Darstellung in der Veröffentlichung von Blum et al nachempfunden.<sup>[95]</sup>



Neben den vierfach substituierten Inhibitoren, wurde auch ein disubstituiertes Grundgerüst basierend auf einem Pyrrolidindiester entwickelt.<sup>[105]</sup> Die Kristallstruktur von einem der disubstituierten Inhibitoren im Komplex mit der HIV-Protease wurde von Jark Böttcher bestimmt. Überraschenderweise befindet sich das Protein in einer geöffneten Konformation und zwei Moleküle besetzen die Bindetasche.<sup>[105]</sup> Während ein Molekül die beiden katalytischen Aspartate adressiert, interagiert das zweite mit der *Flap*-Region und bildet Kontakte mit einem im Kristallverband benachbarten Proteinmolekül.<sup>[105]</sup>

Die Protonierung der katalytischen Diade sowie des Pyrrolidin-Stickstoffs in einem HIV-Protease-Komplex mit einem dieser Inhibitoren wurde von Paul Czodrowski genauer untersucht. Seine Berechnungen ergeben, dass die beiden Aspartate deprotoniert vorliegen sollten, während der Pyrrolidin-Stickstoff protoniert ist.<sup>[107]</sup> Diese Beobachtung ist interessant, da normalerweise eines der beiden katalytischen Aspartate protoniert vorliegt während das andere deprotoniert ist.<sup>[66, 108]</sup> Bei der Ligandbindung ändert sich demnach der Protonierungszustand der katalytischen Diade.

Torsten Luksch beobachtete, dass diese Inhibitoren auch gegenüber Plasmepsin II und IV eine gute Affinität zeigen und führte dazu ausführliche Dockingstudien durch.<sup>[94]</sup> Der auf diesem Weg postulierte Bindemodus für die disubstituierten wie auch tetrasubstituierten Inhibitoren ist in Abbildung 3.25 zu sehen.

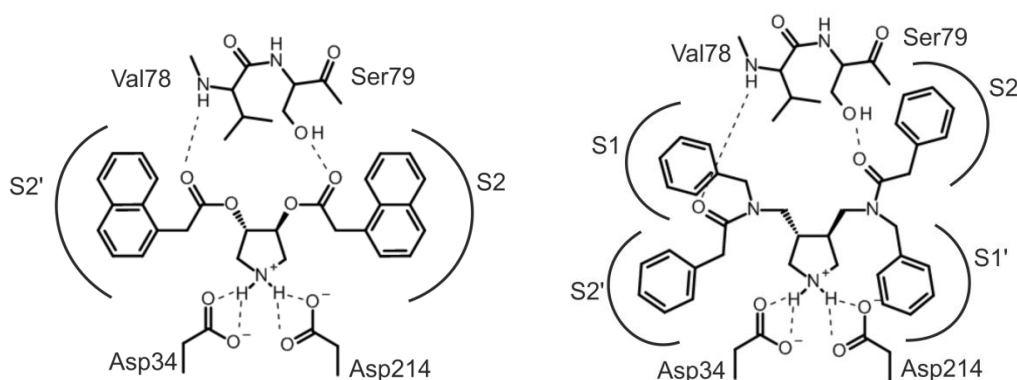


Abbildung 3.25: Dockinglösungen eines disubstituierten und eines tetrasubstituierten Pyrrolidins in Plasmepsin II.<sup>[94]</sup>

### 3.3.2 Affinitätsbestimmungen

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Bindemodus dieser Inhibitoren auf den Pepsin-ähnlichen Aspartylproteasen mit Hilfe einer Kristallstruktur genauer untersucht werden. Hierfür wurde Endothiapepsin als Modellprotein gewählt. Um geeignete Inhibitoren für die Kristallisation zu ermitteln, wurde eine Vielzahl dieser Inhibitoren in

einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  gegen Endothiapepsin vermessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.8 zusammengefasst.

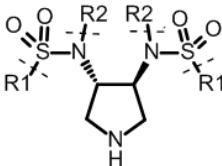
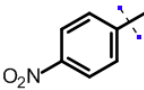
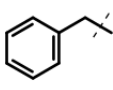

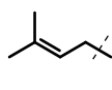
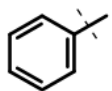
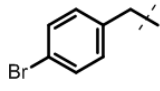


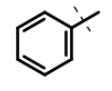
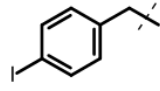


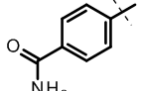
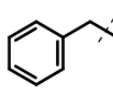

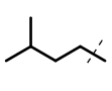
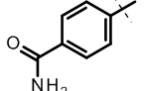
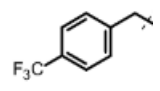
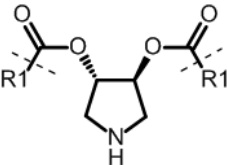
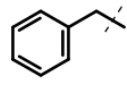

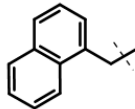
<div></div>							
ID	R1	R2	% Inh. bei 100 μM	ID	R1	R2	% Inh. bei 100 μM
AB83			16 %	AB102			53 %
AB86			18 %	AB100			37 %
AB88			57 %	AB115			24 %
AB99			51 %	AB116			17 %
AB111			88 %				
<div></div>							
ID	R1	% Inh. bei 100 μM	ID	R1	% Inh. bei 100 μM		
ST34		k.l.	ST36		k.l.		
ST47		61 %					

Tabelle 3.8: Assayergebnisse verschiedener Inhibitoren mit einem Pyrrolidin-Grundgerüst für Endothiapepsin. Es wurde jeweils die prozentuale Inhibition bei 100  $\mu\text{M}$  verglichen mit einer Kontrolle ohne Inhibitor bestimmt.

Die Affinitäten weisen, verglichen mit der HIV-Protease und Plasmepsin, ähnliche Tendenzen auf. So war AB111 auch für die HIV-Protease der affinste Inhibitor dieser Serie. ST47 war für Plasmepsin II und IV mit Abstand der affinste disubstituierte Inhibitor und auch für die HIV-Protease bei den besten dieser Serie.<sup>[94, 95, 105]</sup>

Für die Kristallisationsexperimente wurden die affinsten Inhibitoren jeder Serie, AB111 und ST47, ausgewählt. Im Laufe des Projekts wurde für ST47 eine Kristallstruktur erhalten, was diesen Inhibitor auch für andere Untersuchungen besonders interessant machte. Um eine mit anderen Assaysystemen prinzipiell vergleichbare Affinität zu erhalten, wurde für ST47 der  $K_i$  bestimmt. Für ST47 ergab sich ein  $K_i$  von 15  $\mu\text{M}$ .

### 3.3.3 Bestimmung der Kristallstruktur

Sowohl ST47 als auch AB111 wurden zusammen mit Endothiapepsin zur Kokristallisation angesetzt. Die Inhibitorkonzentration in den Ansätzen betrug jeweils 2 mM.

Die in den Ansätzen mit AB111 nach mehreren Wochen erhaltenen extrem feinen nadelförmigen Kristalle waren für eine Datensammlung ungeeignet. Aus diesem Grund wurde neben der Standard-Kristallisationsbedingung für AB111 auch die für NC239 erfolgreich angewandte alternative Kristallisationsbedingung ausprobiert (siehe Kapitel 3.2). Unter Verwendung dieser Bedingung wurden Kristalle mit einer ausreichenden Qualität erhalten. Leider zeigte der anschließend aufgenommene Datensatz, dass der Inhibitor nicht gebunden hatte.

In den Ansätzen mit ST47 wuchsen nach 4 Tagen Kristalle. Von einem dieser Kristalle konnte am SLS (Swiss Light Source) ein Datensatz mit einer Auflösung von 1.35 Å aufgenommen werden. Abbildung 3.26 zeigt die Differenzelektronendichte bei 2.0  $\sigma$ . Der gebundene Ligand zeichnet sich deutlich in der Dichte ab.

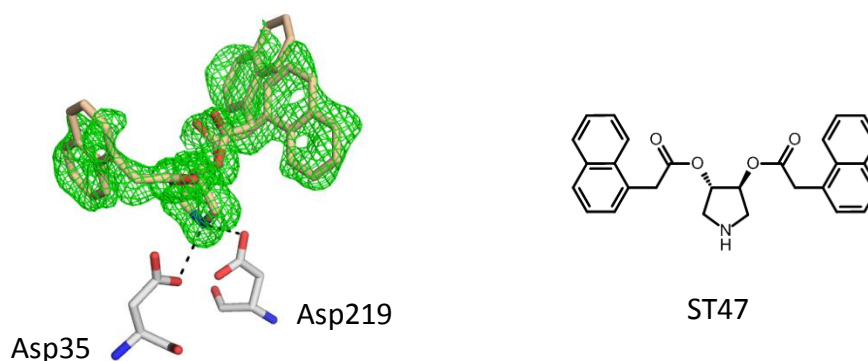


Abbildung 3.26: : Links: Bindung von ST47 an die katalytische Diade. In grün ist die Differenzelektronendichte  $mF_o - DF_c$  bei 2.0 sigma wiedergegeben. Rechts: Strukturformel von ST47

Während die Dichte für den zentralen Pyrrolidinring sehr gut definiert ist, ist die Dichte für beiden Substituenten nur schlecht umrissen. Einer der beiden Reste liegt in zwei Konformationen vor, deren Besetzung zu 45 und 55 % verfeinert wurde. Der Pyrrolidinring scheint an der katalytischen Diade fixiert, während der restliche Ligand eine hohe Flexibilität aufweist. Abbildung 3.27 zeigt den Bindemodus im Detail.

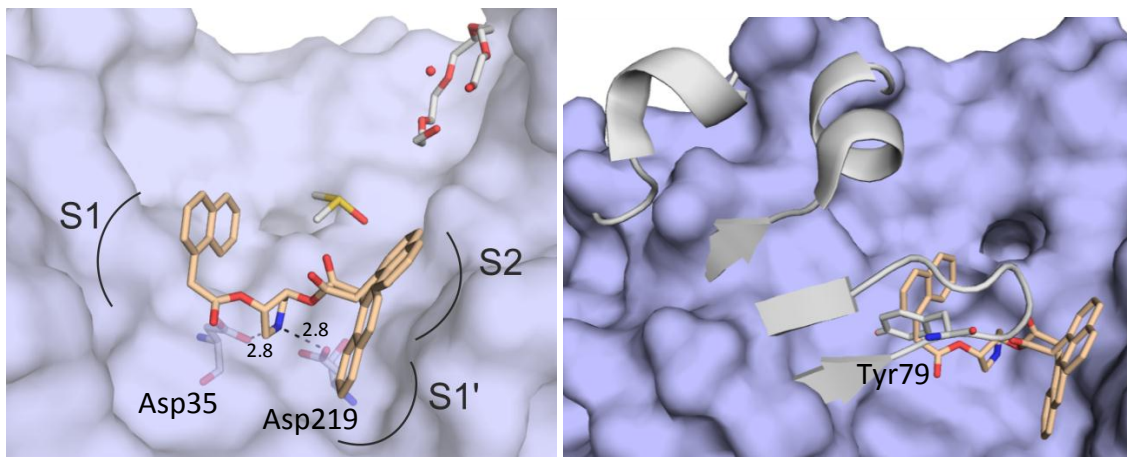


Abbildung 3.27: Links: Bindung von ST47 in der Bindetasche. Neben dem Liganden befinden sich noch ein DMSO und ein PEG Molekül in der Bindetasche. Rechts: Einige Bereiche des Proteins sind ungeordnet. In blau ist die Oberfläche der in der Kristallstruktur sichtbaren Bereiche gezeigt. In weiß ist in *Cartoon*-Darstellung eine Struktur mit vollständig sichtbarem Protein überlagert (Endothiapepsin im Komplex mit Benzamidin, PDB Code: 3PCZ<sup>[109]</sup>). Tyr79 der überlagerten Struktur ist mit seiner Seitenkette dargestellt. In der Konformation mit geschlossener, konformativ geordneter *Flap*-Region würde Tyr79 mit dem Inhibitor kollidieren. In Folge tritt eine Unordnung der *Flap*-Region auf und eine Schleife sowie zwei helicale Abschnitte lassen sich nicht in der Elektronendichte der Komplexstruktur finden.

Wie erwartet bindet ST47 mit dem Pyrrolidin-Stickstoff zwischen die beiden katalytischen Aspartate. Ansonsten werden keine weiteren polaren Interaktionen ausgebildet. Einer der beiden Substituenten kommt im Bereich vor der S1-Tasche zu liegen, der andere Rest adressiert zu je etwa 50 % den Bereich der S1'- bzw. der S2-Tasche. Neben dem Liganden befinden sich noch ein DMSO und ein PEG-Molekül in der Bindetasche. Der Sauerstoff des DMSO Moleküls bildet eine Wasserstoffbrücke zu dem Amid-Stickstoff von Thr223 (nicht im Bild).

Ein auffälliges Merkmal der Komplexstruktur von ST47 ist, dass einige Bereiche des Proteins in der Dichte nicht zu sehen und höchstwahrscheinlich ungeordnet sind. Ein Überblick über die im Modell fehlenden Proteinbereiche gibt die rechte Seite von Abbildung 3.27. Die in der vorliegenden Kristallstruktur mit eindeutig definierter Dichte sichtbaren Bereiche (blaue Oberfläche) wurden mit einer vollständigen Struktur (weißes *Cartoon*-Darstellung, Tyr79) überlagert, um die fehlenden Bereiche darzustellen.

Neben dem *Flap*-Bereich sind noch zwei weitere benachbarte Helices ungeordnet. In allen anderen im Rahmen dieser Arbeit bestimmten Kristallstrukturen von Endothiapepsin waren diese Bereiche eindeutig definiert. Lediglich für die Spitze der *Flap*-Region (Gly80, Asp81, Gly82) wurde in einigen Fällen unzulänglich definierte Dichte beobachtet. In der normalerweise beobachteten Position der *Flap*-Schleife würde Tyr79 mit dem Inhibitor kollidieren. Somit ist eine weit geöffnete *Flap* Voraussetzung für den hier beobachteten Bindemodus.

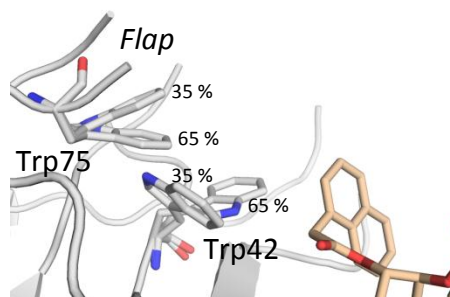


Abbildung 3.28: Trp42 sowie Trp75 liegen in dieser Kristallstruktur beide in zwei Konformationen vor.

In dieser Kristallstruktur wurden für Trp42 sowie Trp75 zwei Konformationen beobachtet die auf 35 und 65 % verfeinert wurden (Abbildung 3.28). Trp75 ist die vorletzte noch sichtbare Aminosäure der *Flap*-Region. In allen anderen im Rahmen dieser Arbeit aufgenommen Strukturen sind beide Tryptophane in der Dichte eindeutig definiert.

Die Struktur von Endothiapepsin im Komplex mit ST47 wurde in der Proteindatenbank mit dem PDB Code 3Q6Y hinterlegt. In Tabelle 3.9 sind die kristallographischen Details aufgelistet.

#### Kristallographische Tabelle

Inhibitor	<b>ST47</b>
PDB Code	3Q6Y
<b>Datensammlung und Prozessierung</b>	
Sammlungsort	SLS
$\lambda$ [Å]	1.000
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>
Einheitszellkonstanten	
a [Å]	45.4
b [Å]	72.8
c [Å]	51.8
$\beta$ [°]	108.6

Auflösung [Å]	1.35
Höchste Auflösungsschale	1.37 - 1.35
Anzahl einzelner Reflexe	68334
R <sub>sym</sub> [%] <sup>a</sup>	4.1 (31.5)
Vollständigkeit [%] <sup>a</sup>	98.0 (78.9)
Redundanz <sup>a</sup>	3.6 (2.3)
I/σ <sup>a</sup>	28.6 (2.8)
<b>Verfeinerung</b>	
Verwendetes Program	Phenix
Anisotrop verfeinert	Nein
Letzter R <sub>free</sub> <sup>b</sup>	18.4
Letzter R <sub>work</sub> <sup>b</sup>	16.6
Anzahl Wassermoleküle	223
Ramachandran Diagramm	
Bevorzugte Regionen (%)	94.4
Erlaubte Regionen (%)	5.6
Erweiterte erlaubte Regionen(%)	0
Verbotene Regionen (%)	0
Durchschnittliche B-Werte (Å <sup>2</sup> )	
Protein Atome	12.7
Wasser Moleküle	23.1
Inhibitoren	22.6
Andere Liganden <sup>c</sup>	30.9
RMSD Bindungslängen [Å]	0.005
RMSD Bindungswinkel [°]	1.079
<sup>a</sup> Wert in Klammern bezieht sich auf die höchste Auflösungsschale	
<sup>b</sup> die angegebenen R-Werte beziehen sich jeweils auf die gesamten Daten	
<sup>c</sup> andere Liganden sind Glycerol, DMSO und PEG	

Tabelle 3.9: Kristallographische Tabelle

### 3.3.4 ITC Messungen

Die Berechnungen von Paul Czodrowski sagen für die HIV-Protease mit Pyrrolidinbasierten Inhibitoren eine zweifach deprotonierte katalytische Diade voraus.<sup>[107]</sup> Im unkomplexierten Zustand ist in der HIV-Protease ein Aspartat protoniert und das zweite deprotoniert.<sup>[66, 108]</sup> Somit wird bei der Bindung des Liganden ein Proton abgegeben. Um dies experimentell zu überprüfen, eignet sich die Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC). Mit Hilfe der ITC lässt sich die Bindungsenthalpie bestimmen. Der Beitrag zur Enthalpieänderung, welcher durch die Abgabe eines Protons an das Lösungsmittel zustande kommt, hängt von der Ionisierungsenthalpie des verwendeten Puffersystems ab während die Enthalpieänderung durch die Ligandbindung selbst Pufferunabhängig ist. Durch einen Vergleich der Enthalpieänderungen in verschiedenen Puffersystemen lässt sich demnach eine Aussage treffen, ob und wenn ja wie viele Protonen bei der Ligandbindung an das Puffersystem abgegeben oder von diesem aufgenommen werden.

Ein Nachteil der ITC ist der verhältnismäßig hohe Proteinverbrauch. Von der HIV-Protease stehen aufgrund der aufwendigen Proteingewinnung derzeit nur begrenzte Mengen zur Verfügung. Aus diesem Grund wurde Endothiapepsin als Modellsystem gewählt. Da der Bindemodus von ST47 an Endothiapepsin bekannt war, wurden die Messungen mit diesem Liganden durchgeführt.

Es wurden drei im sauren einsetzbare Puffersysteme mit möglichst unterschiedlichen molaren Standardionisierungsenthalpien ( $\Delta_r H^\circ$ ) ausgewählt. Die molare Standardionisierungsenthalpie entspricht der Enthalpieänderung bei Aufnahme von einem Mol Protonen. In Tabelle 3.10 sind die Ionisierungsenthalpien der verwendeten Puffer aufgelistet.

Puffersystem	Ionisierungsenthalpie ( $\Delta_r H^\circ$ )
Acetat-Puffer	0.49 <sup>[110]</sup>
Succinat-Puffer	3.0 <sup>[111]</sup>
Oxalat-Puffer	-7.00 <sup>[111]</sup>

Tabelle 3.10: Literaturwerte für die Standardenthalpien der verwendeten Puffersysteme.

In jedem Puffersystem wurden drei Messungen durchgeführt und die erhaltenen  $\Delta H$  Werte gemittelt. Alle Messungen wurden bei pH 4.7 durchgeführt. Abbildung 3.29 zeigt eine Beispielmessung für jedes Puffersystem sowie die für dieses Puffersystem bestimmte Bindungsenthalpie. Es fällt auf, dass die absoluten Ausschläge in den Rohdaten in allen Puffersystemen verhältnismäßig gering sind, was die Auswertung erschwert. Eine Erhöhung der Ligand sowie Proteinkonzentration würde zu deutlicheren Signalen führen, war aber aufgrund der schlechten Löslichkeit des Liganden nicht möglich. Insbesondere bei den Messungen mit Oxalsäure als Lösungsmittel ist der Unterschied zwischen der Bindungsenthalpie und der Verdünnungswärme so gering, dass eine sinnvolle Auswertung nicht möglich ist. Die Bindungsenthalpie für dieses Puffersystem wurde mit Null angenähert.

Die so erhaltenen Bindungsenthalpien wurden gegen die Ionisierungsenthalpien der einzelnen Puffersysteme aufgetragen (Abbildung 3.30). Eine durch die drei Punkte gelegte Ausgleichsgerade weist eine negative Steigung von -0.7 auf. Somit werden bei der Ligandbindung 0.7 Protonen an das umgebende Lösungsmittel abgegeben. Diese Tatsache ist in Übereinstimmung mit der Annahme, dass sich bei der Ligandbindung der Protonierungszustand der katalytischen Diade von monoprotoniert zu deprotoniert ändert.

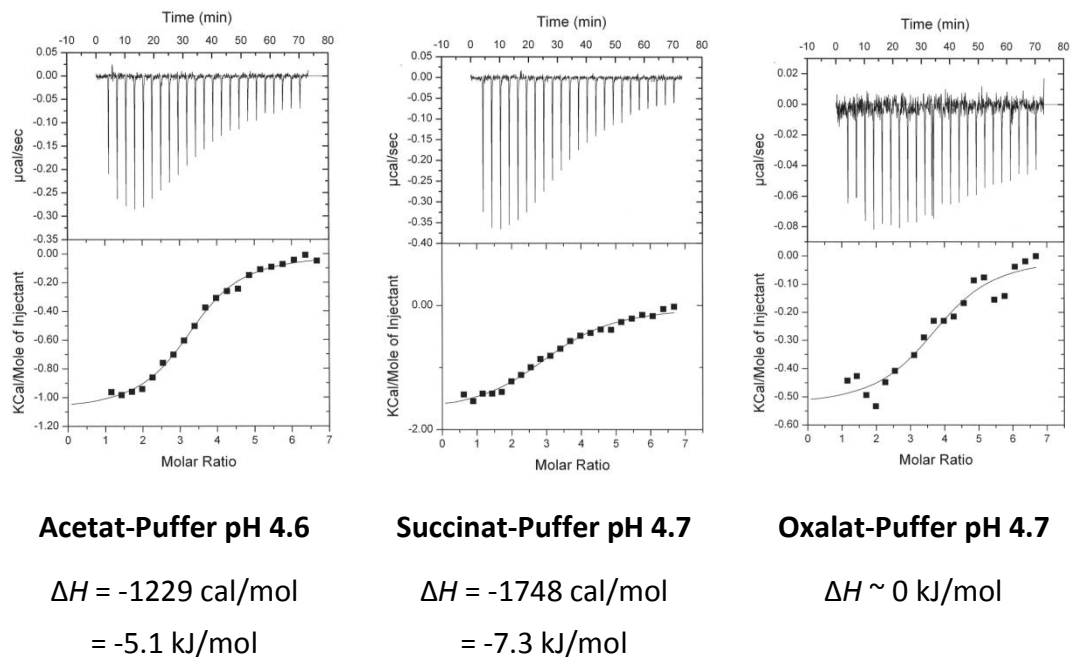


Abbildung 3.29: Rohdaten und Auswertung zu je einer der drei Messungen pro Puffersystem. Die zu jedem Puffersystem angegebenen  $\Delta H$  Werte stellen den aus allen drei Messungen gemittelten Wert da.

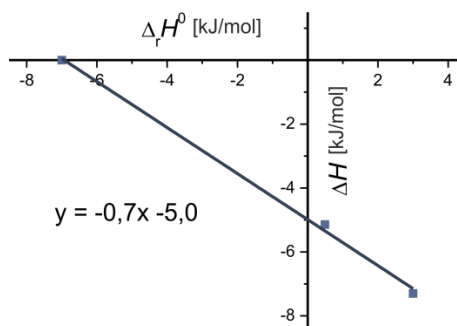


Abbildung 3.30: Auftragung der molaren Standardenthalpien ( $\Delta_r H^\circ$ ) gegen die in diesen Puffersystemen bestimmte Bindungsenthalpie. Zudem ist die Gleichung für die durch die Messpunkte gelegte Ausgleichsgerade angegeben.

Um zu zeigen, dass das abgegebene Proton von der katalytischen Diade stammt, wäre es wünschenswert auch die Pufferabhängigkeit der Bindungsenthalpie im Neutralen zu bestimmen. Im Neutralen liegen beide Aspartate deprotoniert vor, somit sollte dort keine Pufferabhängigkeit beobachtet werden. Es wurde versucht entsprechende ITC



Messungen bei pH 7.0 in einem PIPES-Puffer ( $\Delta_r H^\circ = 11.2$ ), HEPES-Puffer ( $\Delta_r H^\circ = 20.4$ ) sowie Citrat-Puffer ( $\Delta_r H^\circ = -3.38$ ) durchzuführen.<sup>[111]</sup> Aufgrund der schlechten Ligandlöslichkeit und der nur sehr geringen Enthalpieausschläge konnten allerdings keine aussagekräftigen Kurven aufgenommen werden. Die Tatsache, dass die molaren Standardenthalpien der verwendeten Puffer sehr verschieden sind und in keinem dieser Puffersysteme nennenswerte Enthalpieausschläge beobachtet werden konnten, kann als ein vorsichtiger Hinweis gewertet werden, dass im Neutralen keine Pufferabhängigkeit der Bindung besteht.

#### *Weitere Bindungsdaten aus den ITC-Messungen*

Anhand der ITC-Messungen im Acetat und Succinat-Puffer konnten auch die anderen Bindungsparameter bestimmt werden. Tabelle 3.11 zeigt alle in den einzelnen Messungen bestimmten Werte im Überblick. Tabelle 3.12 zeigt die aus allen bestimmten Werten gemittelten thermodynamischen Parameter. Für  $\Delta H$  wurde der Wert des Schnittpunkts der Ausgleichsgerade mit der y-Achse in Abbildung 3.30 gewählt. Dieser Wert gibt die Bindungsenthalpie in einem Puffer mit  $\Delta_r H^\circ = 0$  an und stellt somit eine um die Pufferabhängigkeit bereinigte Bindungsenthalpie dar. Mit diesem Wert wurde anschließend der Entropieanteil der Bindung ( $-T\Delta S$ ) mit Hilfe der Formel  $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$  ausgerechnet.

Messung	Acetat1	Acetat2	Acetat3	Succinat1	Succinat2	Succinat3
$\Delta H$ [cal/mol]	-1096	-1283	-1308	-1775	-1713	-1755
$\Delta H$ [kJ/mol]	-4.6	-5.4	-5.5	-7.4	-7.2	-7.4
$K_a$ [1/M]	$1.82 \cdot 10^5$	$1.64 \cdot 10^5$	$1.32 \cdot 10^5$	$9.39 \cdot 10^4$	$1.07 \cdot 10^5$	$8.03 \cdot 10^4$
n	3.33	3.23	3.57	2.23	2.96	3.22
$K_d$ [μM]	5.5	6.1	7.6	10.6 μM	9.3 μM	12.5 μM
$\Delta G$ [kJ/mol]	-30.0	-29.8	-29.2	-28.4	-28.7	-28.0

Tabelle 3.11 Thermodynamische Daten aus den ITC Messungen in Acetat und Succinat-Puffer.  $\Delta H$ ,  $K_a$  und n ergeben sich direkt aus den Daten.  $K_d$  berechnet sich aus  $K_a$  nach der Formel  $1/K_a = K_d$ .  $\Delta G$  berechnet sich aus  $K_a$  nach der Formel  $\Delta G = -RT \ln(K_a)$  wobei r die allgemeine Gaskonstante und T die absolute Temperatur ist.

Bei den bestimmten Werten fällt auf, dass die Stöchiometrie mit einem Wert um drei sehr hoch ist. Aufgrund des bekannten Bindungsmodus mit einer 1:1 Stöchiometrie ist dieser Wert unwahrscheinlich. Die Stöchiometrie berechnet sich aus den bei der

Messung getroffenen Angaben über die Ligand- und Proteinkonzentration. Die Proteinkonzentration wurde vor dem Umdialysieren des Proteins in den gewünschten Endpuffer und anschließendem Verdünnen über UV-Absorption bestimmt. Damit weist die Konzentration eine nicht unerhebliche Ungenauigkeit auf und ist die wahrscheinlichste Ursache für diese Abweichung.

Thermodynamische Bindungsdaten für ST47 mit Endothiapepsin bei pH 4.7	
$K_d$ [ $\mu\text{M}$ ]	8.6
$\Delta G$ [kJ/mol]	-29.0
$\Delta H$ [kJ/mol] bei $\Delta_r H^\circ = 0$	- 5.0
$-T\Delta S$ [kJ/mol] für $\Delta H = -5,0$	-24.0
An das Lösungsmittel abgegebene Protonen bei der Bindung [ $\text{mol}^{-1}$ ]	0.7

Tabelle 3.12 Thermodynamische Bindungsdaten für die Bindung für ST47 auf Endothiapepsin.

### 3.3.5 Diskussion

#### Die offene Flap

Die ungeordnete *Flap* sowie die beiden ungeordneten angrenzenden Helices sind ein auffälliges Merkmal dieser Struktur. Eine genauere Betrachtung der letzten vor Abbruch der Dichte sichtbaren Aminosäuren der *Flap*-Region lässt vermuten, dass die *Flap* sehr weit geöffnet ist (Abbildung 3.31). Dies ist insofern bemerkenswert, als das bislang in der Proteindatenbank noch keine Endothiapepsin Struktur mit geöffneter *Flap* deponiert wurde.

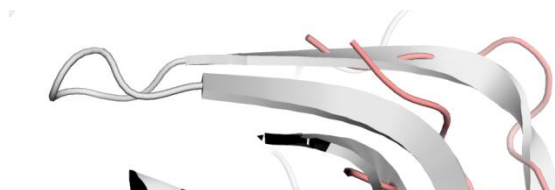


Abbildung 3.31: In weiß ist eine Kristallstruktur von Endothiapepsin mit geschlossener *Flap* (Endothiapepsin im Komplex mit Benzamidin, PDB Code: 3PCZ<sup>[109]</sup>), in rot die überlagerte Kristallstruktur von Endothiapepsin mit ST47 dargestellt (jeweils als *Cartoon*-Darstellung). Vermutlich ist die *Flap* in der Komplexstruktur von ST47 weit geöffnet.

Ein Vergleich dieser Struktur mit einer offenen Plasmepsin II Struktur (PDB Code: 2IGY) ist in Abbildung 3.32 gezeigt. 2IGY ist bestem Wissens nach die Struktur mit dem am weitesten geöffnete *Flap* einer pepsinähnlichen Aspartylprotease. Zur besseren Beurteilung der *Flap*-Öffnung ist jeweils auch eine geschlossene Struktur mit überlagert. Die Abbruchstellen der *Flap* von Endothiapepsin deuten eine ähnlich weite Öffnung an wie sie in der Plasmepsin II Struktur beobachtet wurde. Allerdings scheint sich die *Flap* in eine andere Richtung zu öffnen. Während sich der *Loop* in Plasmepsin hin zur S2-Tasche verschiebt (nach oben im rechten Bild von Abb.3.32), orientiert sich die *Flap* in Endothiapepsin eher in Richtung der S1'-Tasche (nach unten im rechten Bild von Abb.3.32). Die *Flap* bewegt sich demnach offensichtlich anders als es in der Plasmepsin II Struktur beobachtet wurde. In diesem Zusammenhang ist es auch interessant, dass die beiden der *Flap* benachbarten Helices, die in der Endothiapepsin-Struktur ungeordnet sind in Plasmepsin II ihre normale Konformation beibehalten. Um eine Öffnung, wie sie hier in Endothiapepsin beobachtet wurde, zu realisieren, ist es möglicherweise notwendig, dass sich die beiden benachbarten Helices mitbewegen.

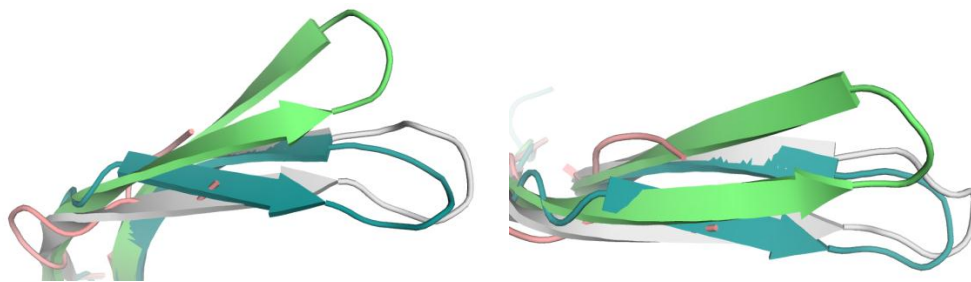


Abbildung 3.32: Überlagerung der *Flap*-Regionen der Komplexstruktur von Endothiapepsin mit ST47 (rot), der geöffneten Plasmepsin II Struktur 2IGY (grün), der geschlossenen Endothiapepsin-Benzamidin Komplexstruktur (weiß) sowie der geschlossenen Plasmepsin II Struktur 1SME (blau). Links ist eine Seitenansicht gezeigt während das rechte Bild die Aufsicht wiedergibt.

Der Mechanismus der *Flap*-Öffnung ist für Endothiapepsin mangels einer Struktur mit offener *Flap* nicht näher bekannt. Die Erkenntnisse zur *Flap*-Öffnung bei anderen pepsin-ähnlichen Aspartylproteasen lassen sich aber auf Endothiapepsin übertragen. Hier spielt das Tyrosin in der *Flap* eine wichtige Rolle. Im geschlossenen Zustand bildet es eine Wasserstoffbrücke zu Trp42, die bei der *Flap*-Öffnung aufgebrochen wird. Durch eine alternative Konformation des Tryptophans und das Wegbewegen des Tyrosins in der *Flap* konnte sowohl bei Plasmepsin II als auch bei Renin eine zusätzliche *Flap*-Tasche beobachtet werden (vgl. dazu auch Kapitel 2.5).

In der hier vorgestellten Struktur wird durch die Öffnung der *Flap* ebenfalls die Wasserstoffbrücke von Tyr79 zu Trp42 aufgebrochen. Während Tyr79 ungeordnet und damit in der Struktur nicht sichtbar ist, finden sich für Trp42 zwei Konformationen.

Neben der die *Flap*-Tasche verschließenden Konformation findet sich eine zweite Konformation, welche die *Flap*-Tasche freigibt. Interessanterweise ist der Indol-Stickstoff in der offenen Konformation, anders als in Plasmepsin II und Renin, dem Protein zugewandt. In Endothiapepsin ist es diesem Stickstoff so möglich eine Wasserstoffbrücke zu Asp107 auszubilden. In Plasmepsin II und Renin finden sich an dieser Stelle mit Isoleucin bzw. Glycin hydrophobe Aminosäuren (Abbildung 3.33).

Während in den Renin und Plasmepsin II Strukturen die *Flap*-Tasche durch den Inhibitor besetzt wird, bleibt in der vorliegenden Endothiapepsinstruktur diese Tasche unbesetzt. Die Tatsache, dass Trp42 trotzdem teilweise umklappt, zeigt das bei geöffneter *Flap* die beiden Konformationen des Tryptophans energetisch sehr nahe beieinander liegen.

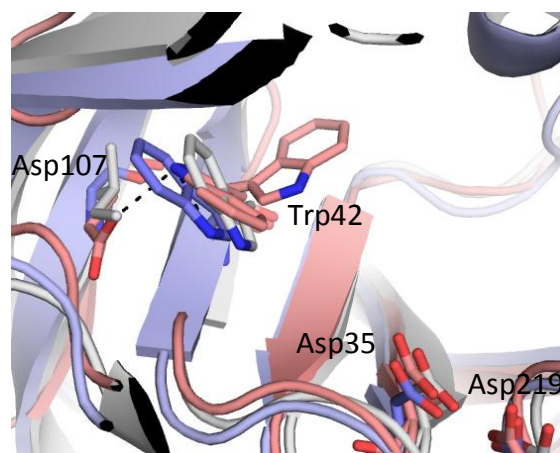


Abbildung 3.33: Die offenen Strukturen von Renin, Plasmepsin II und Endothiapepsin im Vergleich. Neben den Proteinketten in *Cartoon*-Darstellung sind ausgewählte Aminosäuren dargestellt. Plasmepsin II ist mit weißen (PDB Code 2BJU), Renin mit blauen (PDB Code 3OAD) und Endothiapepsin mit roten Kohlenstoffatomen gezeigt. Die Beschriftung der Aminosäuren bezieht sich auf die Endothiapepsin Struktur.

#### *Der Bindemodus von ST47*

Wie erwartet, bindet das Pyrrolidin Grundgerüst an die katalytische Diade indem der Stickstoff den Platz zwischen den beiden Aspartaten einnimmt. Die Dockinglösung sagte eine Adressierung der S2- sowie S2'-Tasche voraus.<sup>[94]</sup> Während einer der beiden Substituenten ungeordnet vor der S2- bzw. S1'-Tasche zu liegen kommt, bindet der zweite Rest überraschenderweise in der S1-Tasche. Die *Flap* verbleibt geöffnet und bietet somit dem Inhibitor den benötigten Platz.

Die weit geöffnete *Flap* kann die Schwierigkeiten bei der Kristallisation erklären. Abbildung 3.34 zeigt die Packung der Protein-Moleküle im Kristall. Im zentralen blau dargestellten Proteinmolekül sind die in der Kristallstruktur sichtbaren Anfänge der *Flap*-Region rot eingefärbt. Die umliegenden Proteinmoleküle sind in verschiedenen

braun-orange Tönen dargestellt. Obwohl die *Flap*-Region selbst keinen Kontakt zu den benachbarten Molekülen ausbildet, ist es dennoch wahrscheinlich, dass die hohe Flexibilität dieses *Loops* in Lösung die Ausbildung der Kristallpackung erschwert.

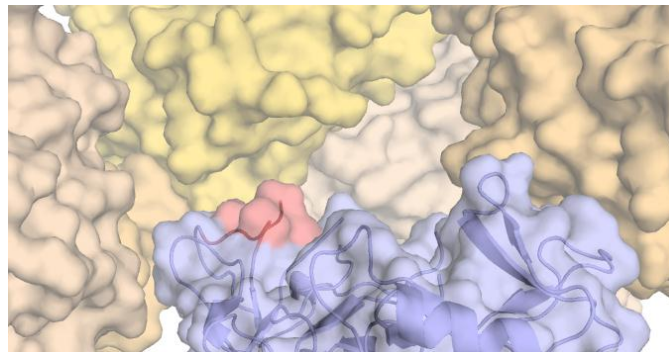


Abbildung 3.34: Kristallpackung der Komplexstruktur von ST47. Für alle Proteinmoleküle ist die lösungsmittelzugängliche Oberfläche dargestellt. Das zentrale blau dargestellte Molekül ist zusätzlich in der *Cartoon*-Darstellung gezeigt. Die letzten in der Struktur sichtbaren Aminosäuren der *Flap*-Region sind rot eingefärbt.

Eine Übertragung des Bindemodus auf die anderen Inhibitoren dieser Serie ist schwierig. Die einzigen polaren Interaktionen, die ST47 mit dem Protein ausbildet, sind die Wasserstoffbrücken zu der katalytischen Diade. Der restliche Ligand zeigt sich sehr flexibel. Dies zeigt sich dadurch, dass die Dichte der Seitenketten ist im Vergleich zu dem zentralen Pyrrolidinring deutlich schlechter definiert ist, wodurch die B-Werte der Ligandatome mit zunehmender Entfernung zum Pyrrolidinring ansteigen (der durchschnittliche B-Wert der Atome des Pyrrolidinrings liegt bei 12, der durchschnittliche B-Wert der Atome der Naphtylen-Ringe bei 27). Allerdings ist es sehr wahrscheinlich, dass auch die anderen Inhibitoren dieser Serie bei geöffneter *Flap* binden. Der größere vierfach substituierte Ligand AB111 hat unter Standardkristallisationsbedingung zu keiner Kristallisation von Endothiapepsin geführt. Möglicherweise zwingt dieser Inhibitor das Protein in eine Konformation in der eine Anordnung, in der unter diesen Bedingungen entstehenden Kristallpackung, nicht mehr möglich ist. Die Suche nach alternativen Kristallisationsbedingungen, in der Endothiapepsin im Komplex mit AB111 kristallisiert, würde somit eine Chance bieten eine Kristallstruktur mit weit geöffneter *Flap* zu erhalten. Eine solche Struktur wäre sehr wertvoll für das Verständnis der Flexibilität der Pepsin-ähnlichen Aspartylproteasen.

### *Die Protonierung der katalytischen Diade*

Die ITC-Messungen haben gezeigt, dass bei pH 4.7 während der Ligandbindung 0.7 Protonen an das Lösungsmittel abgegeben werden. Dieser Wert kann als die Abgabe eines Protons an das Lösungsmittel gedeutet werden. Da der  $pK_a$  Wert der beiden katalytischen Aspartate des Endothiapepsins nicht exakt bekannt ist, lässt sich keine definitive Aussage über die theoretisch erwartete Anzahl an abgegebenen Protonen treffen. Allerdings liegt der  $pK_a$  Wert der beiden katalytischen Aspartate vermutlich im Bereich der optimalen Proteinaktivität, die mit pH 4.5 angegeben wird.<sup>[44]</sup> An diesem Punkt liegen die deprotonierte und protonierte Form im Gleichgewicht vor, wodurch bei einem pH-Wert von 4.5 eine Abgabe von 0.5 Protonen an das Lösungsmittel zu erwarten wäre.

Der Ligand ist unter den experimentellen Bedingungen (pH 4.7) am Pyrrolidin-Stickstoff protoniert. Die katalytische Diade des unkomplexierten Proteins sollte monoprotoniert vorliegen. Das abgegebene Proton kann somit theoretisch sowohl vom Liganden als auch von der katalytischen Diade stammen. Da es unwahrscheinlich ist, dass der Pyrrolidin-Stickstoff sein Proton abgibt (der  $pK_a$  von Pyrrolidin in Wasser liegt bei 11.3), kann davon ausgegangen werden, dass das Proton von der katalytischen Diade stammt. Diese liegt somit bei der Ligandbindung deprotoniert vor. Dieses Ergebnis bestätigt die Berechnungen, die von Paul Czodrowski durchgeführt wurden.

Die weiteren thermodynamischen Parameter zeigen, dass die Bindung von ST47 an das Protein stark entropisch getrieben ist. Von den -29 kJ/mol die bei der Bindung frei werden, stammen -24 kJ/mol aus dem entropischen und lediglich -5 kJ/mol aus dem enthalpischen Anteil. Die überwiegend entropische Bindung lässt sich anhand der Kristallstruktur nachvollziehen. Lediglich der Pyrrolidin-Stickstoff bildet eine gerichtete Interaktion mit dem Protein aus, während der restliche Ligand sehr flexibel ist. Auch die ungeordnete *Flap*-Region sowie die Verdrängung der Wassermoleküle in der Bindetasche tragen zu einer erhöhten Entropie bei.

### 3.3.6 Zusammenfassung

Für einen disubstituierten, Pyrrolidin-basierten Inhibitor konnte die Kristallstruktur im Komplex mit Endothiapepsin bestimmt werden. ST47 bildet lediglich mit dem Pyrrolidinstickstoff eine polare Interaktion zu dem Protein aus. Der restliche Ligand ist in der Bindetasche vergleichsweise flexibel. Überraschenderweise bindet der Ligand mit einem Substituenten im Bereich der S1-Tasche und verdrängt damit die *Flap* aus ihrer Position, die ebenso wie zwei angrenzende Helices in der Kristallstruktur ungeordnet vorliegt. Das Tryptophan, welches die *Flap*-Tasche verschließt, ist in dieser Struktur teilweise rotiert und gibt somit die *Flap*-Tasche frei.

Bislang ist keine Kristallstruktur von Endothiapepsin mit geöffneter *Flap* bekannt. In der Proteindatenbank gibt es für einige Pepsin-ähnliche Aspartylproteasen Strukturen mit leicht geöffneter *Flap*, aber lediglich für Renin und Plasmepsin II sind bisher Kristallstrukturen mit geöffneter *Flap*-Tasche verfügbar. Während bei diesen Strukturen diese Tasche durch einen Inhibitor besetzt wird, verbleibt in der hier beschriebenden Struktur die *Flap*-Tasche unbesetzt und das die Tasche verschließende Tryptophan findet sich in zwei Positionen. Die beiden Positionen dieses Tryptophans sind demnach bei einmal geöffneter *Flap* energetisch sehr eng beieinander. Zudem deuten die sichtbaren Bereiche der *Flap*-Region eine andere als die von Plasmepsin bekannte Öffnungsrichtung an. Somit liefert die ST47 Komplexstruktur einen wertvollen Beitrag zum besseren Verständnis der Proteinflexibilität der Pepsin-ähnlichen Aspartylproteasen und Endothiapepsin im Speziellen. Eine möglichst genaue Kenntnis über die Proteinflexibilität ist insbesondere für die erfolgreiche computergestützte Vorhersage von Bindeposen von entscheidender Bedeutung. Nicht selten führen unerwartete Konformationsänderungen auf der Proteinseite zu falschen Vorhersagen, wie auch das hier beschriebene Beispiel der Pyrrolidin-basierten Inhibitoren zeigt.

Zudem konnten die Berechnungen von Paul Czodrowski, wonach die katalytische Diade bei der Ligandbindung deprotoniert vorliegt, mit Hilfe von ITC Messungen bestätigt werden. Die Möglichkeit die Protonierung der katalytischen Diade korrekt vorherzusagen ist ein weiterer wichtiger Punkt für die erfolgreiche Anwendung von computergestützten Designmethoden. Die Aspartate weisen je nach Protonierungszustand andere Eigenschaften als Wasserstückbrücken -Donor oder -Akzeptor auf, was für die gebundenen Liganden entscheidend ist.

### 3.4 Ritonavir und Saquinavir:

#### Der Bindemodus klassischer HIV-Protease Inhibitoren mit den Pepsin-ähnlichen Aspartylproteasen

Dass die klassischen, klinisch eingesetzten HIV-Protease-Inhibitoren auch in der Lage sind, die Pepsin-ähnliche Aspartylproteasen zu inhibieren, ist schon lange bekannt. Die hier vorgestellten Strukturen von Endothiapepsin im Komplex mit Ritonavir und Saquinavir sowie von SAP2 mit Ritonavir zeigen erstmals den Bindemodus dieser Inhibitoren mit einer Pepsin-ähnlichen Aspartylprotease. Dabei überrascht vor allem der Bindemodus von Saquinavir, da hier die Adressierung der katalytischen Diade von dem klassischen Muster mit einer zwischen den Aspartaten gebundenen Hydroxygruppe abweicht. Damit, und auch durch den Vergleich der Ritonavir Komplexstrukturen, sind diese Strukturen eine interessante Fallstudie, inwieweit eine Übertragbarkeit von Bindungsmodi zwischen verschiedenen Proteinen so einfach angenommen werden darf.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Strukturen sind Bestandteil einer Publikation (Behnen et al. *Experimental and Computational Active Site Mapping as a Starting Point to Fragment-based Lead Discovery*, ChemMedChem, 2012)<sup>[109]</sup>. Die hier beschriebenen Strukturen dienen dort der Demonstration der Relevanz experimentell bestimmter Bindungsmoden von Benzamindin. Diese Thematik wird im Zusammenhang mit den Benzamindin Komplexstrukturen in Kapitel 3.5 diskutiert.

#### 3.4.1 Einleitung

Die HIV-Protease gehört zu der Familie der retroviralen Aspartylproteasen. Als solche ist das Protein ein Homodimer, d.h. es ist aus zwei identischen Untereinheiten zusammengesetzt. Jede Untereinheit steuert ein Aspartat der katalytischen Diade und eine Hälfte der Bindetasche bei. Im Gegensatz zu den Pepsin-ähnlichen Aspartylproteasen resultiert somit eine symmetrische Bindetasche. Abbildung 3.35 zeigt die Faltung der HIV-Protease und Endothiapepsin im Vergleich. Die HIV-Protease ist ein wichtiges Enzym der HI-Viren. Die Protease spaltet neu synthetisierte Polypeptidketten und überführt sie damit in funktionstüchtige Virusproteine. Da ohne die HIV-Protease die HI-Viren nicht vermehrungsfähig sind, ist sie ein interessantes und ausgiebig erforschtes Zielprotein für die Arzneistoffentwicklung. Momentan befinden sich zehn HIV-Protease Inhibitoren in der klinischen Anwendung. Schon seit längerem ist bekannt, dass viele dieser HIV-Inhibitoren auch die Pepsin-ähnlichen Aspartylproteasen hemmen. So wurde insbesondere die Inhibition der SAP-Enzyme und damit des Wachstums von *Candida albicans* im Detail beschrieben und diskutiert.<sup>[112-116]</sup>



Zudem wurde eine Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems (bei einer Überdosis) wie auch eine Wachstumshemmung von *Plasmodium falciparum* beobachtet.<sup>[117, 118]</sup> Damit bieten die klinisch eingesetzten HIV-Inhibitoren einen möglichen Ausgangspunkt für die Entwicklung neuer Arzneistoffe gegen Candidose oder Malaria. Insbesondere der Umstand, dass eine Candidose häufig im Zusammenhang mit einer HIV-Infektion auftritt bietet hier interessante Möglichkeiten. Trotz des Interesses an diesem Thema wurde bis jetzt noch keine Kristallstruktur einer pepsinähnlichen Aspartylprotease im Komplex mit einem der klinisch eingesetzten HIV-Protease Inhibitoren beschrieben.

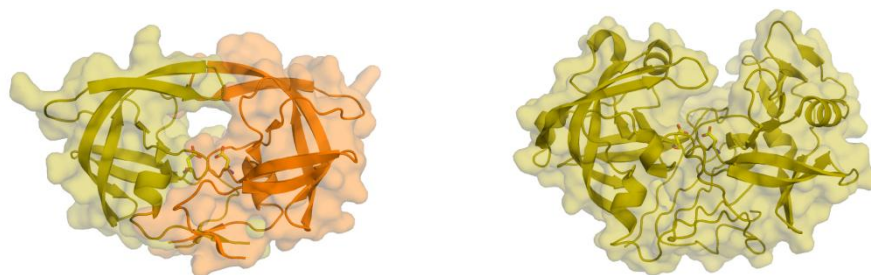


Abbildung 3.35: Die Faltung der HIV Protease (links) und Endothiapepsin (rechts) im Vergleich. Beide Proteine sind als *Cartoon* umgeben von Ihrer Oberfläche dargestellt. Zur besseren Orientierung sind zusätzlich die katalytischen Aspartate gezeigt. Im Falle der HIV-Protease sind beide Monomere verschieden eingefärbt. Zur Darstellung wurden die Strukturen mit dem PDB-Code 2B60 sowie 1OEW (ohne die jeweiligen Liganden) verwendet.<sup>[39, 40]</sup>

Für diese Arbeit wurden die Inhibitoren Ritonavir und Saquinavir ausgewählt. Diese beiden Substanzen zählen zu den ersten und damit bestuntersuchtesten HIV-Protease Inhibitoren und zeigen eine gute Affinität gegenüber den pepsinähnlichen Aspartylproteasen. Backman et. al. bestimmten mittels SPR-Messungen die Affinität von Ritonavir, Saquinavir sowie anderen HIV-Protease Inhibitoren gegenüber der SAP2.<sup>[112]</sup> Ritonavir erreichte einen  $K_d$  von 470 nM, Saquinavir war mit 67  $\mu$ M deutlich schwächer. Im Rahmen dieser Arbeit wurden in einem Fluoreszenz-basiertem Assay die Affinitäten von Ritonavir und Saquinavir gegen Endothiapepsin bestimmt. Für Endothiapepsin waren beide Inhibitoren deutlich affiner, wobei auch hier Ritonavir mit einem  $K_i$  von 15 nM affiner war als Saquinavir mit 48 nM.

#### 3.4.2 Bestimmung der Kristallstrukturen

Ritonavir und Saquinavir wurden zur Kokristallisation mit Endothiapepsin und SAP2 angesetzt. Die Inhibitorkonzentration betrug jeweils 2 mM. In allen Fällen wurden Kristalle guter Qualität erhalten. Von Endothiapepsin im Komplex mit Ritonavir, SAP2 im Komplex mit Ritonavir und Endothiapepsin im Komplex mit Saquinavir wurde auf diese Weise eine Kristallstruktur erhalten. Von SAP2 im Komplex mit Saquinavir konnte

leider keine Struktur bestimmt werden. Die entsprechenden Kristalle hatten den Inhibitor nicht gebunden. Möglicherweise ist dies auf die geringe Affinität von Saquinavir gegenüber der SAP2 zurückzuführen. Im Folgenden werden die drei erhaltenen Kristallstrukturen vorgestellt.

### *Endothiapepsin im Komplex mit Ritonavir*

Der Datensatz von Endothiapepsin im Komplex mit Ritonavir wurde am SLS (Swiss Light Source) mit einer Auflösung von 1.38 Å gesammelt. Die Differenzelektronendichte zeigt deutlich den gebundenen Inhibitor (Abbildung 3.36).

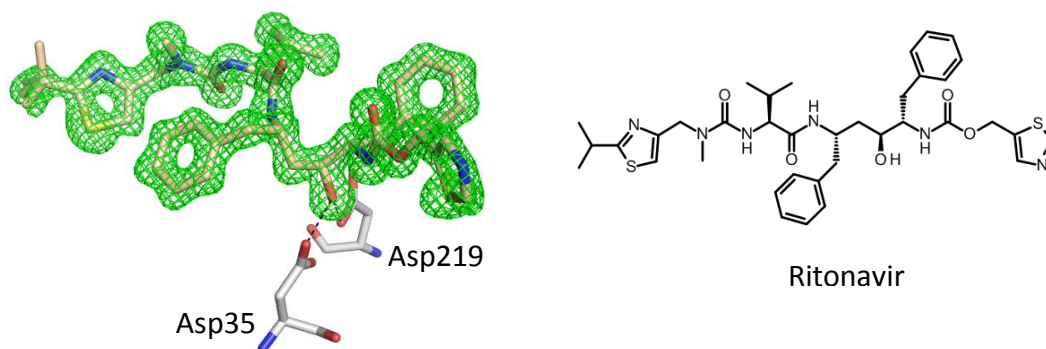


Abbildung 3.36: : Links: Bindung von Ritonavir an die katalytische Diade. In grün ist die Differenzelektronendichte  $mF_o - DF_c$  bei 3.0 sigma wiedergegeben. Rechts: Strukturformel von Ritonavir.

Neben Ritonavir finden sich noch ein DMSO Molekül und ein PEG Molekül in der Bindetasche. Abbildung 3.37 zeigt einen Überblick über alle Moleküle der Bindetasche sowie den detaillierten Bindemodus von Ritonavir.

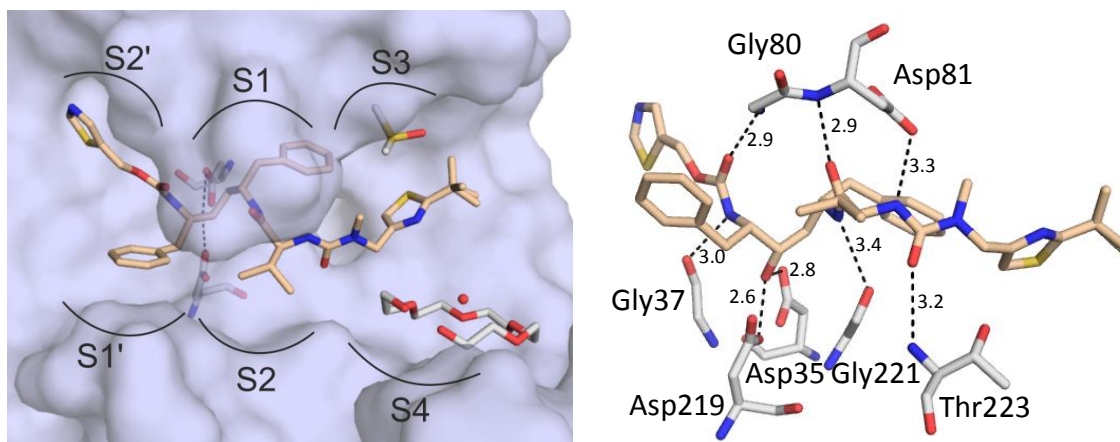


Abbildung 3.37: Alle in der Bindetasche gebundenen Moleküle sowie der detaillierte Bindemodus von Ritonavir. Die Abstände der Wasserstoffbrückenbindungen sind in Å angegeben.

Wie erwartet bindet Ritonavir mit seiner Hydroxygruppe zwischen die beiden katalytischen Aspartate. Die drei hydrophoben Seitenketten adressieren die S1', S2 sowie S1-Tasche. Die Thiazolgruppe ohne den Isopropyl-Substituenten zeigt in die S2'-Tasche. Die Thiazolgruppe am anderen Ende des Liganden liegt im Bindetaschenbereich zwischen der S3- und S4-Tasche. An polaren Interaktionen bildet Ritonavir insgesamt acht Wasserstoffbrückenbindungen zum Protein aus. Neben den beiden Interaktionen der Hydroxygruppe zu den katalytischen Aspartaten bildet jede der drei amidähnlichen Funktionalitäten eine Interaktion sowohl zur *Flap*-Region als auch zu dem Boden der Bindetasche aus. Somit bindet Ritonavir analog den peptidähnlichen Inhibitoren mit denen es auch strukturell verwandt ist. Die der S1/S2 Seite des Proteins zugewandte Carbonylfunktion bildet eine Wasserstoffbrücke zu Gly80 der *Flap*-Region, der zugehörige Stickstoff bindet an Gly37. Die zentrale Amidfunktion interagiert mit ihrer Carbonylgruppe mit dem Rückgrat von Asp81. Der Amidstickstoff bildet eine Wasserstoffbrücke zu Gly221. Die letzte Carbonylfunktion bindet an Thr223 am Boden der Bindetasche, während der zugehörige Stickstoff an einen Carboxylsauerstoff von Asp81 bindet. Der Isopropylsubstituent am Thiazol liegt in der Kristallstruktur in zwei Konformationen vor, die zu 35 und 65 % besetzt sind. Diese Besetzungen korrelieren mit der Besetzung des in der S3-Tasche gefundenen DMSO Moleküls. Dieses DMSO ist lediglich zu 35 % besetzt. Die zu 65 % vorliegende Konformation des Isopropylsubstituenten kommt dem DMSO zu nahe, sodass bei Anwesenheit des DMSO-Moleküls sich dieser Teil wegbewegt. Abbildung 3.38 zeigt den Bindemodus des DMSO Moleküls sowie die beiden Konformationen des Isopropylsubstituenten im Detail. Vor dem Bereich der S4-Tasche ist ein PEG-Bruchstück gebunden. An dieser Stelle wurde bereits in der Komplexstruktur mit RB91 ein PEG Bruchstück gefunden (vgl. Kapitel 3.1).

Die Struktur wurde in der Proteindatenbank unter dem Code 3PRS hinterlegt.

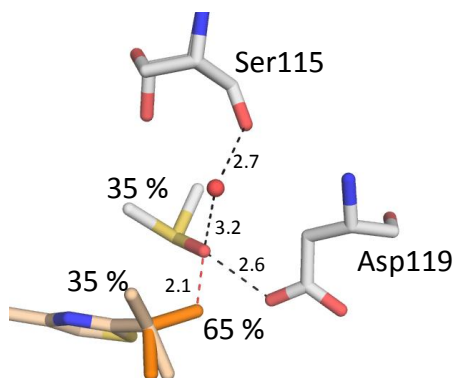


Abbildung 3.38 Das in der S3-Tasche gebundene DMSO ist lediglich zu 35 % besetzt. In den Fällen, in denen das DMSO Molekül gebunden hat, ist der Isopropylsubstituent des Liganden weggedreht (Kohlenstoffatome in hellbraun). In der zu 65 % besetzten Konformation (Kohlenstoffatome in orange) würde der Ligand dem DMSO zu nahe kommen. Mit schwarzen gestrichelten Linien sind die Interaktionen des DMSO Moleküls mit dem Protein dargestellt. Die rote gestrichelte Linie zeigt den Abstand des DMSO Moleküls zu der Isopropylgruppe.

### SAP2 im Komplex mit Ritonavir

Der Datensatz von SAP2 im Komplex mit Ritonavir wurde am SLS (Swiss Light Source) gesammelt und weist eine Auflösung von 1.40 Å auf. Abbildung 3.39 zeigt die Differenzdichte. Saquinavir ist klar in an die beiden katalytischen Aspartate gebunden. In Abbildung 3.40 ist ein Überblick über die Lage in der Bindetasche sowie der detaillierte Bindemodus dargestellt.

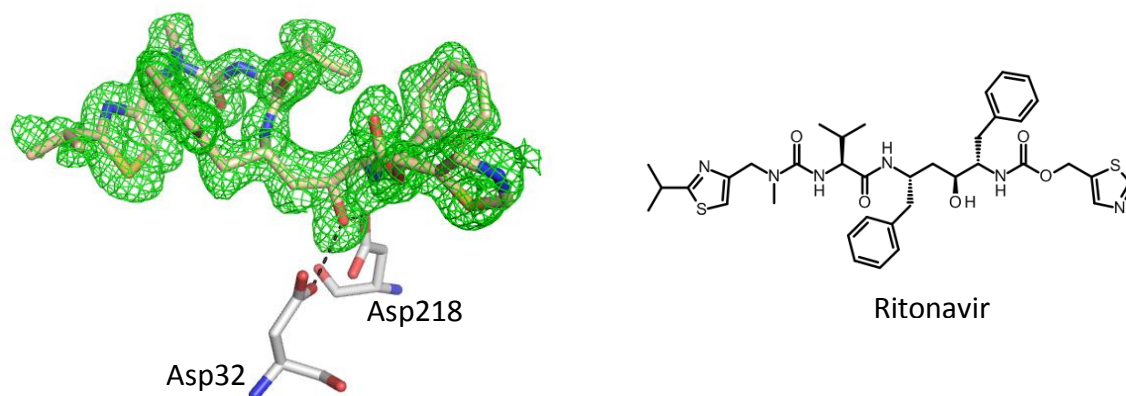


Abbildung 3.39: Links: Bindung von Ritonavir an die katalytische Diade. In grün ist die Differenzelektronendichte  $mF_o-DF_c$  bei 2.0 sigma wiedergegeben. Rechts: Strukturformel von Ritonavir.

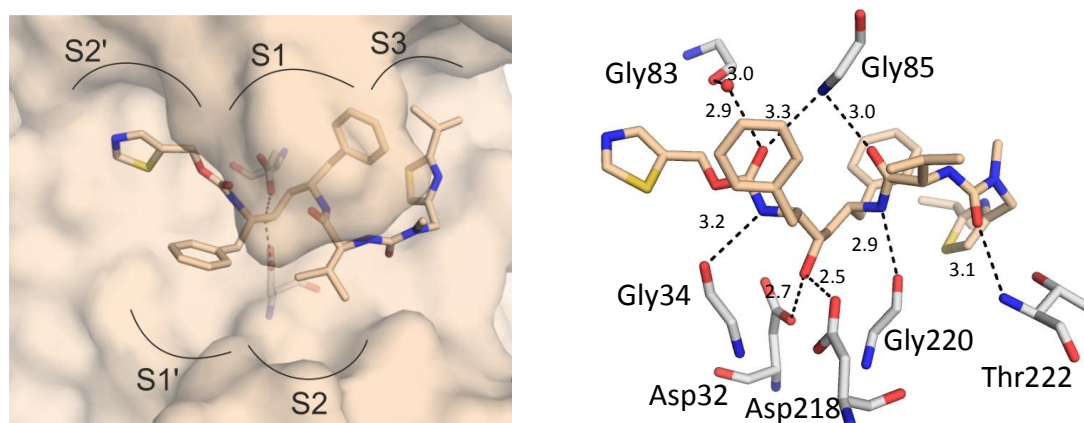


Abbildung 3.40: Überblick über die Lage von Ritonavir in der Bindetasche der SAP2 sowie der detaillierte Bindemodus. Die Längen der Wasserstoffbrückenbindungen sind in Å angegeben.

Der Bindemodus von Ritonavir in SAP2 ist mit dem in Endothiapepsin nahezu identisch. Auch hier wird die katalytische Diade über die Hydroxygruppe adressiert. Die Taschenbesetzung gleicht ebenfalls der in Endothiapepsin gefundenen. Analog zu Endothiapepsin werden zu Gly34, Gly220 und Thr222 am Boden der Bindetasche Wasserstoffbrücken ausgebildet. Anders hingegen gestaltet sich die Adressierung der *Flap*-Region. Die Carbonylgruppe auf der Seite des unsubstituierten Thiazolrings bildet

über ein Wasser vermittelt eine Interaktion zu Gly83 und befindet sich zudem im Wasserstoffbrückenabstand zu Gly85, wobei die Wechselwirkung zu Gly85 aufgrund der mit 3.3 Å eher langen Distanz und des ungünstigen Winkels als eher schwach einzuschätzen ist. Die zentrale Carbonylgruppe bildet ebenfalls eine Wasserstoffbrücke zu Gly85, welche aufgrund ihres Abstands (3.0 Å) und Bindungswinkels günstiger erscheint.

Die Struktur wurde in der Proteindatenbank unter dem Code 3Q70 hinterlegt.

### Endothiapepsin im Komplex mit Saquinavir

Die letzte Struktur dieser Serie ist Endothiapepsin im Komplex mit Saquinavir. Dieser Datensatz wurde am BESSY in Berlin gesammelt und weist eine Auflösung von 1.22 Å auf. Die Differenzelektronendichte ist in Abbildung 3.41 gezeigt. Das gebundene Saquinavir ist in der Differenzelektronendichte gut sichtbar.

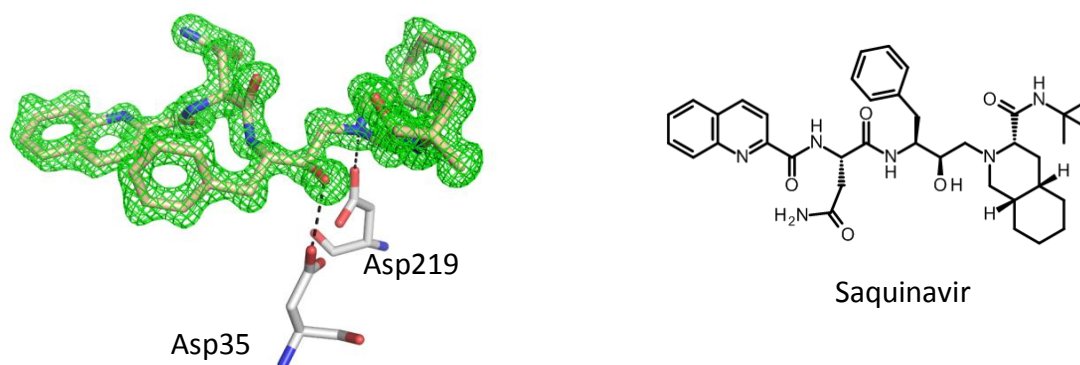


Abbildung 3.41: Links: Bindung von Saquinavir an die katalytische Diade. In grün ist die Differenzelektronendichte  $mF_0 - DF_0$  bei 3.0 sigma wiedergegeben. Rechts: Strukturformel von Saquinavir.

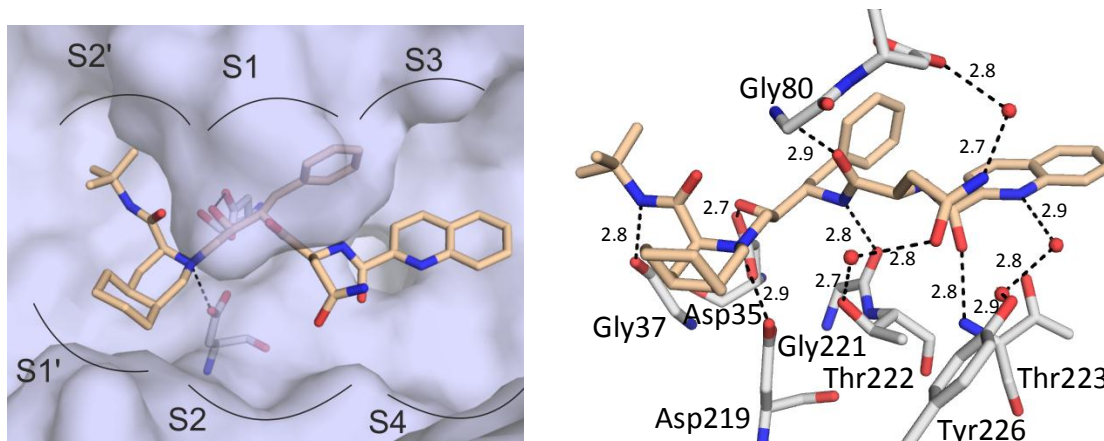


Abbildung 3.42: Überblick über die Lage von Saquinavir in Endothiapepsin sowie der Bindemodus im Detail. Die Länge der Wasserstoffbrückenbindungen ist in Å angegeben.

Abbildung 3.42 zeigt die Lage von Saquinavir in der Bindetasche sowie den detaillierten Bindemodus. Überraschend ist, dass die Hydroxygruppe nicht analog zu Ritonavir zwischen den beiden Aspartaten gebunden hat. Saquinavir adressiert die katalytische Diade indem die Hydroxygruppe über Asp35 zu liegen kommt und der tertiäre Stickstoff eine Interaktion zu Asp219 ausbildet. Die weitere Taschenbesetzung ist dem Bindemodus von Ritonavir ähnlich. Die S2'-, S1'- sowie S1-Tasche werden von hydrophoben Resten besetzt. Der Isoquinolinrest kommt in dem Bindetaschenbereich zwischen der S3- und S4-Tasche zu liegen und bildet über zwei Wassermoleküle vermittelt eine Interaktion zu Tyr226. Die Carboxamidfunktionalität liegt vor der S2-Tasche. Über jeweils ein Wasser vermittelt bindet sie an Thr222 und Asp81. Im Rückgrat des Inhibitors finden sich drei Amidbindungen. Der Amidstickstoff neben der Tertiärbutylgruppe bildet eine Wasserstoffbrückenbindung zu Gly37. Das zentrale Amid interagiert mit seinem Carbonylsauerstoff mit Gly80 der *Flap*-Region während der zugehörige Stickstoff eine Wasserstoffbrücke zu Gly221 ausbildet. Das endständige Amid bildet mit seiner Carbonylgruppe eine Interaktion zu Thr223 aus.

Im Gegensatz zu der Komplexstruktur von Ritonavir in Endothiapepsin finden sich in dieser Struktur neben Saquinavir keine weiteren Liganden in der Bindetasche.

Die Struktur wurde in der Proteindatenbank unter dem Code 3PWW hinterlegt.

### Kristallographische Tabelle

Inhibitor	Ritonavir	Ritonavir	Saquinavir
Protein	EP	SAP2	EP
PDB Code	3PRS	3Q70	3PWW
<b>Datensammlung und Prozessierung</b>			
Sammlungsort	SLS	SLS	BESSY (BL 14.2)
$\lambda$ [Å]	1.000	1.000	0.91841
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>
Einheitszellkonstanten			
a [Å]	45.3	49.3	45.4
b [Å]	72.7	65.5	73.0
c [Å]	52.3	98.5	52.9
$\beta$ [°]	108.9		109.7
Auflösung [Å]	40.0-1.38	30.0-1.40	30.0-1.22
Höchste Auflösungsschale	(1.40-1.38)	(1.42-1.40)	(1.24-1.22)
Anzahl einzelner Reflexe	64937 (2597)	62389 (2678)	94163 (3980)
R <sub>sym</sub> [%] <sup>a</sup>	3.8 (16.8)	5.9 (34.7)	4.9 (33.2)
Vollständigkeit [%] <sup>a</sup>	98.3(79.5)	98.5 (85.1)	97.4 (83.1)
Redundanz <sup>a</sup>	3.7 (3.0)	4.2 (2.2)	2.3 (1.9)
I/ $\sigma$ <sup>a</sup>	31.8 (6.0)	22.6 (2.5)	16.7 (2.7)
<b>Verfeinerung</b>			
Verwendetes Program	SHELXL	SHELXL	PHENIX



Anisotrop verfeinert	Ja	Nein	Nein
Letzter $R_{\text{free}}^b$	15.1	20.4	17.8
Letzter $R_{\text{work}}^b$	11.8	17.5	16.2
Anzahl Wassermoleküle	313	210	447
Ramachandran Diagramm			
Bevorzugte Regionen (%)	93.9	90.1	93.1
Erlaubte Regionen (%)	6.1	9.2	6.9
Erweiterte erlaubte Regionen (%)	0	0.3	0
Verbotene Regionen (%)	0	0.3	0
Durchschnittliche B-Werte ( $\text{\AA}^2$ )			
Protein Atome	10.6	13.1	9.0
Wasser Moleküle	24.8	20.9	21.1
Inhibitor	13.4	21.2	12.1
Andere Liganden <sup>c</sup>	28.2	19.7	14.5
RMSD Bindungslängen [ $\text{\AA}$ ]	0.011	0.011	0.005
RMSD Bindungswinkel [ $^\circ$ ]	2.8	2.8	1.1

<sup>a</sup> Wert in Klammern bezieht sich auf die höchste Auflösungsschale

<sup>b</sup> die angegebenen R-Werte beziehen sich jeweils auf die gesamten Daten

<sup>c</sup> andere Liganden sind Glycerol, DMSO und PEG

Tabelle 3.13: Kristallographische Tabelle

In der SAP2-Komplexstruktur befindet sich Gln11 in der verbotenen Zone des Ramachandran Plots. Diese Aminosäure befindet sich an der Spitze einer klassischen  $\gamma$ -Wendung und wurde auch schon in früheren Strukturen in dieser Geometrie beschrieben.<sup>[119, 120]</sup>

### 3.4.3 Diskussion

Es konnten insgesamt drei Komplexstrukturen von HIV-Protease-Inhibitoren mit Endothiapepsin bzw. SAP2 erhalten werden. Ritonavir konnte erfolgreich mit beiden Proteinen kristallisiert werden, während von Saquinavir lediglich eine Kristallstruktur mit Endothiapepsin gelang. Neben einem Vergleich der beiden Ritonavirstrukturen ist auch insbesondere ein Vergleich der hier gefundenen Bindungsmodi mit den Bindungsmodi in der HIV-Protease interessant.

#### *Vergleich der beiden Ritonavir-Strukturen*

Ritonavir nimmt in beiden Proteinen einen nahezu identischen Bindemodus ein (Abb. 3.43). Wie schon im Abschnitt 3.4.2 diskutiert sind die zum Protein eingegangenen Wechselwirkungen vergleichbar. Interessant ist, das Ritonavir trotz der fast identischen Lage in der Bindetasche unterschiedliche Interaktionen zur *Flap*-Region

ausbildet (Abb. 3.44) obwohl sich in beiden Proteinen hier die gleichen Aminosäuren finden.

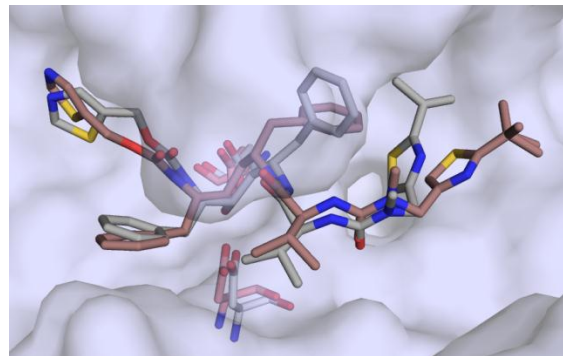


Abbildung 3.43: Überlagerung der Bindemodi in Endothiapepsin und SAP2. In hellblau ist die Oberfläche von Endothiapepsin gezeigt. Die Kohlenstoffe der Endothiapepsin Struktur sind rot (Aspartate) bzw. rotbraun (Ligand) eingefärbt während die Kohlenstoffe der SAP2 Struktur in weiß (Aspartate) und grau (Ligand) dargestellt sind.

Die Konformation der *Flap*-Region unterscheidet sich in beiden Proteinen nur minimal. Durch die leicht andere Konformation unterscheiden sich allerdings die Interaktionen mit dem Liganden entscheidend (vgl. Abb. 3.44). So bildet der Stickstoff von Tyr79 in Endothiapepsin eine Interaktion mit der ersten Carbonylgruppe des Liganden. In der SAP2 ist diese Interaktion durch die Verschiebung der *Flap* abgeschwächt und wird durch eine über ein Wasser vermittelte Interaktion von Ritonavir zu Gly83 ergänzt. Der Stickstoff von Tyr84 der SAP2 ist zusätzlich in der Lage, eine Wasserstoffbrücke zu der zentralen Carbonylgruppe des Liganden auszubilden. In Endothiapepsin hingegen findet sich eine Interaktion dieser zentralen Carbonylgruppe mit Gly80. Die Carboxygruppe des *Flap*-Aspartats bildet in Endothiapepsin eine Wasserstoffbrücke zu Ritonavir welche durch die nach oben verschobene Position in SAP2 nicht mehr möglich ist.

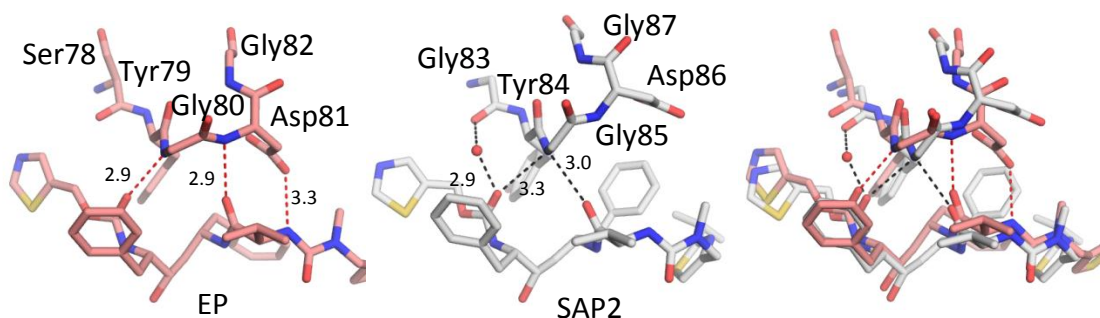


Abbildung 3.44: Detailansicht der Interaktionen zur *Flap*-Region. Die Kohlenstoffe der Endothiapepsinstruktur sind rot eingefärbt während die Kohlenstoffe der SAP2 Struktur in weiß dargestellt sind. Wasserstoffbrückenbindungen sind im Falle der Endothiapepsinstruktur mit rot gestrichelten Linien, im Falle der SAP2-Struktur mit schwarz gestrichelten Linien wiedergegeben. Die Abstände einiger Wasserstoffbrücken sind in Å angegeben.



Als Ursache für die veränderte *Flap*-Konformation lässt sich eine unterschiedliche Adressierung der S1-Tasche ausmachen (Abb. 3.45). Während in Endothiapepsin der Phenylring zum Boden der Bindetasche zeigt, ist dieser in SAP2 zur *Flap* gerichtet und verdrängt das *Flap*-Aspartat aus seiner Position. Diese Position des Phenylrings ermöglicht dem hinteren Teil des Ritonavirs die Besetzung der S3-Tasche. Da das Platzangebot der S1-Tasche in beiden Proteinen vergleichbar ist, kann über die Gründe dieser unterschiedlichen Ligandkonformationen lediglich spekuliert werden. Möglicherweise wird in der SAP2 die bessere Besetzung der S3-Tasche durch eine etwas schlechtere Adressierung der *Flap*-Region ermöglicht. Den Ausschlag für den einen oder anderen Bindungsmodus kann sich aus einer Aufsummierung vieler kleiner Unterschiede ergeben.

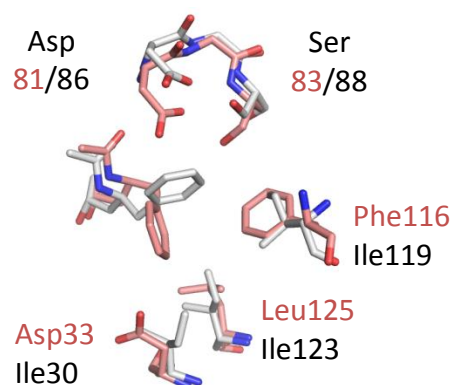


Abbildung 3.45: Detailansicht der S1-Tasche. Die Kohlenstoffe der Endothiapepsinstruktur sind rot eingefärbt während die Kohlenstoffe der SAP2 Struktur in weiß dargestellt sind. Zur besseren Unterscheidung ist die Beschriftung der Aminosäuren für Endothiapepsin ebenfalls rot.

In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Adressierung der *Flap*-Region in der Endothiapepsin-Saquinavir Komplexstruktur mit der in der SAP2-Ritonavir Struktur gefundenen vergleichbar ist. Der Phenylring, der die S1-Tasche besetzt, ist hier ebenfalls zur *Flap*-Region hin orientiert und verdrängt das *Flap*-Aspartat aus seiner Position. Auch die daraus resultierende veränderte Interaktion mit dem Liganden ist ähnlich. Diese Beobachtung spricht dafür, dass der in SAP2 gefundene Bindemodus von Ritonavir prinzipiell auch in Endothiapepsin möglich ist.

#### *Vergleich mit den Bindemodi in der HIV-Protease*

Die Strukturen von Ritonavir und Saquinavir im Komplex mit der HIV-Protease sind beide in der Proteindatenbank verfügbar und in Abbildung 3.46 im Vergleich zu den hier diskutierten Endothiapepsinstrukturen dargestellt.

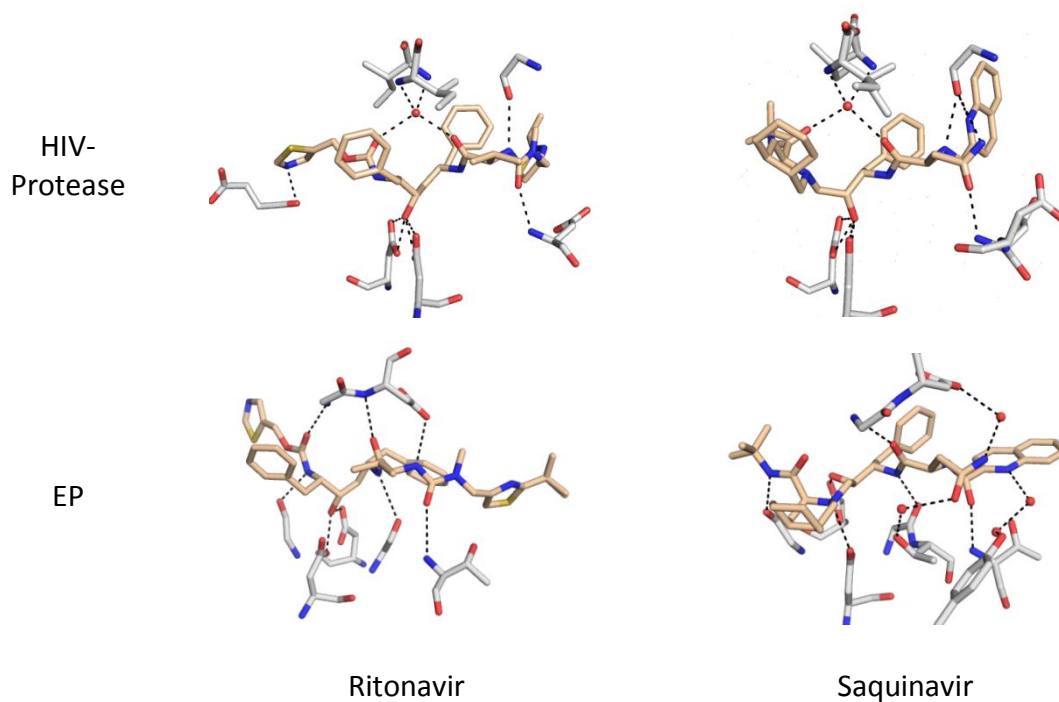


Abbildung 3.46: Die Bindemodi von Ritonavir und Saquinavir im Komplex mit der HIV-Protease und Endothiapepsin im Vergleich. In der oberen Zeile ist der Bindemodus in den beiden HIV-Protease-Strukturen dargestellt, in der unteren die der dazugehörigen Endothiapepsin-Strukturen. Links ist jeweils die Ritonavir-Struktur rechts die Saquinavir-Struktur gezeigt. Für die Erstellung der Bilder wurden die Strukturen mit dem PDB-Code 3OXC (HIV-Protease im Komplex mit Saquinavir) und 1HXW (HIV-Protease im Komplex mit Ritonavir) verwendet.<sup>[121, 122]</sup>

Beim Vergleich der verschiedenen Bindemodi lassen sich in der Adressierung der *Flap* sowie der Adressierung der katalytischen Diade zwei prinzipielle Unterschiede ausmachen, die hier genauer diskutiert werden sollen.

Die unterschiedliche Adressierung der *Flap*-Region ist beim Betrachten der Bindungsmodi der auffälligste Unterschied. Während die Inhibitoren in Endothiapepsin direkte Wechselwirkungen zur *Flap* ausbilden, sind, aufgrund eines größeren Abstands zwischen der katalytischen Diade und der *Flap*-Region, in der HIV-Protease die Interaktionen über ein Wasser vermittelt. Ein analoges Verhalten ist bereits für Pepstatin bekannt. Auch hier findet sich in der HIV-Protease ein über Wasser vermittelter Kontakt zur *Flap*-Region während in den Pepsin-ähnlichen Aspartylproteasen diese Region direkt adressiert wird.<sup>[123]</sup>

Überraschend ist die unterschiedliche Adressierung der katalytischen Diade der beiden Saquinavirstrukturen. Während in der HIV-Protease die Hydroxygruppe zwischen den beiden Aspartaten zu liegen kommt, adressiert in Endothiapepsin diese Gruppe Asp35 von oben während das zweite Aspartat eine Wechselwirkung zu dem tertiären Stickstoff des Decahydrochinolines ausbildet. Die Frage, weshalb Saquinavir für Endothiapepsin eine andere Adressierung der katalytischen Diade wählt als mit der

HIV-Protease, lässt sich allerdings anhand der Strukturen nicht beantworten. Dieses ungewöhnliche Muster zur Adressierung der katalytischen Diade ist, mit einem sekundären anstelle des hier beschriebenen tertiären Stickstoffs, bereits auf der  $\beta$ -Sekretase beobachtet worden.<sup>[69]</sup>

#### 3.4.4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden erstmals die Bindungsmodi zweier klinisch angewandter HIV-Protease Inhibitoren für pepsinähnliche Aspartylproteasen beschrieben. Die drei erhaltenen Komplexstrukturen von Ritonavir mit SAP2 sowie Endothiapepsin und Saquinavir mit Endothiapepsin bieten damit die Grundlage für ein besseres Verständnis des Verhaltens der Inhibitoren für diese Proteinfamilie. Darüber hinaus sind die Strukturen ein interessantes Beispiel zur Übertragbarkeit von Bindemodi auf andere Proteine.

Ein Vergleich der beiden Ritonavir Strukturen zeigt einen prinzipiell identischen Bindungsmodus wobei sich dennoch insbesondere in der Adressierung der *Flap*-Region Unterschiede ergeben. Besonders interessant ist, dass schon eine kleine Verschiebung der *Flap* zu einer in wesentlichen Punkten anderen Interaktion mit dem Inhibitor führt. Diese Beobachtung unterstreicht nochmals wie wichtig es ist, die Flexibilität der *Flap*-Region insbesondere bei computergestützten Bindungsmodi-Vorhersagen adäquat zu berücksichtigen.

Bei der Struktur von Endothiapepsin im Komplex mit Saquinavir fällt eine ungewöhnliche Adressierung der katalytischen Diade auf. Entgegen der Erwartung bindet die Hydroxygruppe nicht zwischen den beiden katalytischen Aspartaten sondern ist auf Asp35 ausgerichtet, während das andere Aspartat eine Wechselwirkung zum tertiären Stickstoff des Liganden ausbildet. Dieses Beispiel zeigt eindrucksvoll, dass selbst bei einem so bekannten Interaktionsmuster wie der zwischen die Aspartate platzierten Hydroxygruppe eine einfache Übertragung des Bindemodus nicht immer möglich ist.

### 3.5 Benzamidin und Inhibitoren mit einer zentralen Hydrazidfunktion

#### Einstieg in das fragmentbasierte Wirkstoffdesign

Dieses sowie das darauffolgende Kapitel beschäftigen sich mit dem fragmentbasierten Wirkstoffdesign für Aspartylproteasen. Die in diesem Kapitel vorgestellten Strukturen demonstrieren, dass es prinzipiell möglich ist, Komplexstrukturen von kleinen, schwachbindenden Liganden sowohl für Endothiapepsin wie auch der SAP2 zu erhalten, und diese Strukturen in der Lage sind, relevante Interaktionspunkte in diesen Proteinen aufzuzeigen. Die hier gewonnenen Erfahrungen dienen als Grundlage für das in Kapitel 3.6 vorgestellte Durchmusterung einer kompletten Fragmentbibliothek.

Die in diesem Kapitel vorgestellten Strukturen von Endothiapepsin und SAP2 im Komplex mit Benzamidin sind Bestandteil einer Publikation (Behnen et al. *Experimental Active Site Mapping as a Starting Point to Fragment-based Lead Discovery*, ChemMedChem, 2012)<sup>[109]</sup>. In dieser Veröffentlichung wird die experimentelle Ausleuchtung von Bindetaschen mit Hilfe von Sondenmolekülen mit computergestützten Methoden verglichen. Um die Relevanz der experimentell bestimmten Hotspots zu bestimmen, wurden die Bindemoden der Sonden denen von hochaffinen Liganden gegenübergestellt.

#### 3.5.1 Einleitung

In den vorherigen Kapiteln wurden Komplexstrukturen von verhältnismäßig großen und gut bindenden Liganden, welche bereits für eine Inhibition der Aspartylproteasen synthetisiert und optimiert wurden, vorgestellt. Um erfolgreich ein Fragment-basiertes Wirkstoffdesign durchzuführen, ist es hingegen notwendig, Kristallstrukturen von kleinen, schwach bindenden und noch nicht optimierten Liganden zu erhalten. Als Modellsystem für die  $\beta$ -Sekretase wurden mit Endothiapepsin bereits von Geschwindner et al. erfolgreich Protein-Fragment Komplexstrukturen erhalten.<sup>[48]</sup> Um zu überprüfen, ob dies auch mit unseren Protokollen gelingt, wurden exemplarisch die Kristallstrukturen mit zwei Fragmenten bestimmt.

Dazu wurden zum einen die für das Fragmentprojekt auf der PKA entwickelten Inhibitoren mit einer zentralen Hydrazonfunktion ausgewählt. Mit einem Molekulargewicht um 300 g/mol gehören diese Inhibitoren zu den eher größeren Fragmenten. Obwohl diese Verbindungen kein typisches zur Adressierung der katalytischen Aspartate genutztes Motiv aufweisen, zeigen einige Vertreter dieser Serie eine gute Inhibition von Endothiapepsin.

Als zweites Fragment wurde das sehr kleine Benzamidin ausgewählt. Mit einem Molekulargewicht von lediglich 120 g/mol befindet es sich im Grenzbereich zu den Sondenmolekülen und zeigt lediglich eine schwache Inhibition von Endothiapepsin. Für Thrombin ist Benzamidin die klassische Gruppe zur Adressierung des Aspartates in der S1-Tasche.<sup>[124]</sup> Dass eine Amidgruppe zur Adressierung der katalytischen Diade der Aspartylproteasen verwendet werden kann, ist für die  $\beta$ -Sekretase bereits bekannt.<sup>[33]</sup>

Somit wurde zum einen ein verhältnismäßig großes und affines Fragment mit schwer abschätzbarem Bindungsmodus und zum anderen ein kleines niedrig affines Molekül mit einer bekannten, zur Adressierung der katalytischen Aspartate geeigneten, Gruppe ausgewählt. Diese beiden Verbindungen eignen sich um nachzuweisen, ob sowohl von sehr kleinen Molekülen wie auch von Fragmenten mit einem ungewöhnlichen Bindemodus erfolgreich Komplexstrukturen erhalten werden können.

Die für verschiedene Inhibitoren mit einer zentralen Hydrazongruppe für Endothiapepsin bestimmten  $K_i$  Werte sind in Tabelle 3.14 dargestellt. Da SB217 mit einem  $K_i$  von 6  $\mu\text{M}$  die beste Affinität aufweist wurde diese Verbindung für die kristallographischen Experimente ausgewählt.

Für Benzamidin konnte selbst bei hohen Ligandkonzentrationen keine Vollinhibition von Endothiapepsin erreicht werden. Somit wurde lediglich die prozentuale Inhibition bei 1mM bestimmt. Benzamidin erreicht bei dieser Konzentration eine 70 %ige Inhibition von Endothiapepsin.

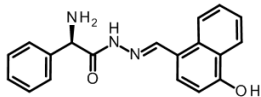
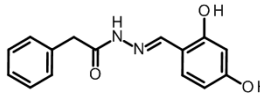
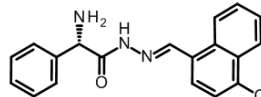
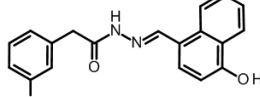
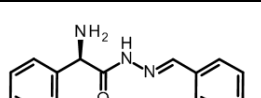
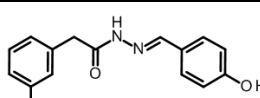
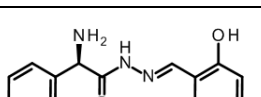
SB217		6 $\mu\text{M}$	SB202		> 500 $\mu\text{M}$
SB190		9 $\mu\text{M}$	SB67		~ 500 $\mu\text{M}$
SB218		170 $\mu\text{M}$	SB47		~ 500 $\mu\text{M}$
SB219		48 $\mu\text{M}$			

Tabelle 3.14:  $K_i$  Werte einiger Inhibitoren mit einem Hydrazongrundgerüst für Endothiapepsin.

### 3.5.2 Bestimmung der Komplexstrukturen mit Endothiapepsin

Benzamidin und SB217 wurden beide mit Endothiapepsin kokristallisiert. Für Benzamidin konnte aufgrund seiner guten Löslichkeit eine Konzentration von 20 mM während der Kokristallisation und 100 mM bei dem anschließenden Soaking erreicht werden. Von SB217 konnten lediglich 2 mM bzw. 10 mM eingesetzt werden. Die so erhaltenen Kristalle wurden am Synchrotron vermessen und dabei konnten mit 1.50 Å für den Benzamidin-Komplex und 1.35 Å für den SB217-Komplex gute Auflösungen erzielt werden.

#### *Endothiapepsin im Komplex mit SB217*

Die erhaltene Differenzelektronendichte zeigt überraschenderweise zwei in der Bindetasche gebundene Moleküle (Abbildung 3.47). Während ein Molekül vollständig zu erkennen ist, bricht die Dichte für das zweite Molekül nach dem Kohlenstoff der Carbonylgruppe ab. Das restliche Molekül ist zum Solvent hin orientiert und ungeordnet. Dass es sich bei dem zweiten Molekül um ein Bruchstück des Inhibitors handelt ist äußerst unwahrscheinlich, da es sich bei der Abbruchstelle nicht um eine chemisch labile Spaltstelle handelt. Für sich im umgebenden Solvent befindliche Molekülteile ist, aufgrund fehlender Proteinkontakte, eine sehr hohe Flexibilität und somit Streuung über zahlreiche Anordnungen zu erwarten, die zu keiner eindeutigen Bestimmung einer Differenzelektronendichte führen.

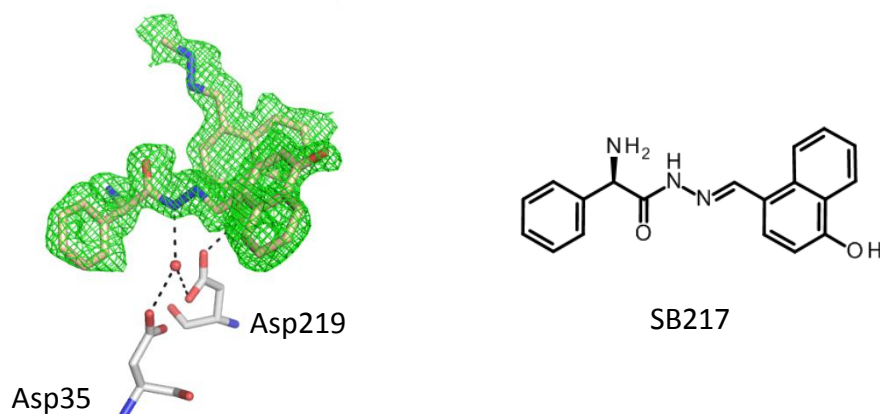


Abbildung 3.47 : Links: Bindung der beiden Moleküle SB217 an die katalytische Diade. In grün ist die Differenzelektronendichte  $mF_o - DF_c$  bei 2.0 sigma wiedergegeben. Rechts: Strukturformel von SB217.

Der detaillierte Bindemodus ist in Abbildung 3.48 dargestellt. Das vollständig sichtbare Molekül bindet mit dem Amidstickstoff der Hydrazonfunktion an das katalytische Wasser, welches die Interaktion zu den beiden Aspartaten vermittelt. Die Naphtholgruppe besetzt die S2'-Tasche während der Phenylring den Raum in der S1-Tasche beansprucht. Zu der *Flap*-Region werden drei Wasserstoffbrücken ausgebildet.

Die Wechselwirkungen zu den Rückgratstickstoffen von Gly80 und Asp81, die von dem zweiten Stickstoff der Hydrazonfunktion sowie der Carbonylgruppe ausgebildet werden, liegen mit 2.9 Å und 3.0 Å im Bereich einer guten Wasserstoffbrücke. Die dritte Interaktion des primären Amins an die Carboxylgruppe von Asp81 ist hingegen mit 3.3 Å deutlich schwächer.

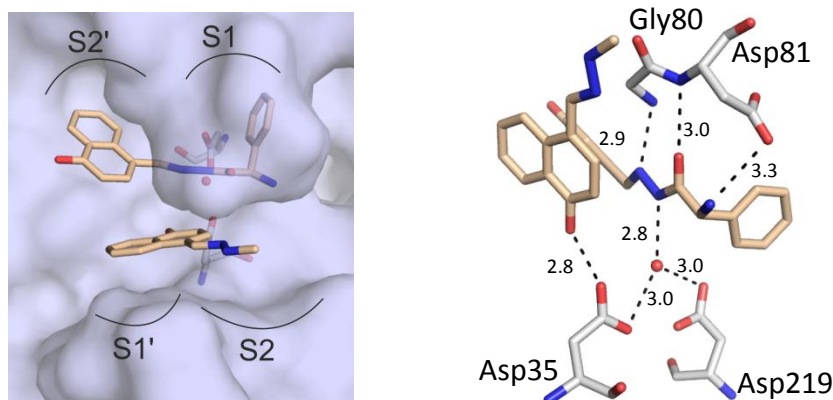


Abbildung 3.48: Überblick über die Lage in der Bindetasche sowie der detaillierte Bindemodus von SB217. Die Längen der Wasserstoffbrückenbindungen sind in Å angegeben.

Das zweite Molekül bindet ebenfalls an eines der beiden katalytischen Aspartate. Mit der Hydroxygruppe des Naphtholrestes wird eine Wasserstoffbrücke zu dem äußeren Sauerstoff von Asp35 ausgebildet. Der restliche Ligand liegt vor der S1'- sowie S2-Tasche und ist zum Solvent hin orientiert.

Diese Struktur wurde in der Proteindatenbank unter den Code 3T7P hinterlegt.

#### *Endothiapepsin im Komplex mit Benzamidin*

Auch hier finden sich in der Bindetasche zwei Moleküle des Inhibitors. Während eines der Benzamide an die beiden Aspartate bindet, befindet sich das zweite in der S1-Tasche (Abbildung 3.49). Das an die katalytische Diade bindende Molekül ist an diese mit insgesamt drei Wasserstoffbrückenbindungen gebunden. Während der eine Amidinstickstoff die zentrale Position des katalytischen Wassers einnimmt, bindet der zweite Amidinstickstoff an den äußeren Sauerstoff von Asp35 und interagiert gleichzeitig über ein Wasser vermittelt mit Ser78 der *Flap*-Region. Unter den experimentellen Bedingungen liegt das Benzamidin protoniert und damit positiv geladen vor. Somit kann zu der negativ geladenen katalytischen Diade zusätzliche eine ionische Bindung ausgebildet werden. Der hydrophobe Benzylrest besetzt die S1'-Tasche.

Das zweite Benzamidin bindet in der S1-Tasche mit einem seiner Stickstoffe an das *Flap*-Aspartat (Asp81) sowie den Hydroxysauerstoff von Ser115. Der zweite Stickstoff

geht eine Interaktion zu dem Carbonylsauerstoff von Ser115 sowie über ein Wasser vermittelt zu Asp119 ein.

Neben den beiden Benzamidinen ist zusätzlich ein Molekül DMSO in der Bindetasche gebunden. Die Sulfonylgruppe ist dabei in ein weitreichendes Wassernetzwerk der Bindetasche eingebunden (Abbildung 3.49). Dieses Wassernetzwerk ist von besonderem Interesse, da in den meisten Komplexstrukturen dieser Bereich unterhalb der *Flap*-Region von den Inhibitoren besetzt, und somit die dort vorhandenen Wasser verdrängt werden. Das Netzwerk verbindet Asp35 der katalytischen Diade mit Gly80 der *Flap*-Region sowie Gly221 und Thr222 am Boden der Bindetasche.

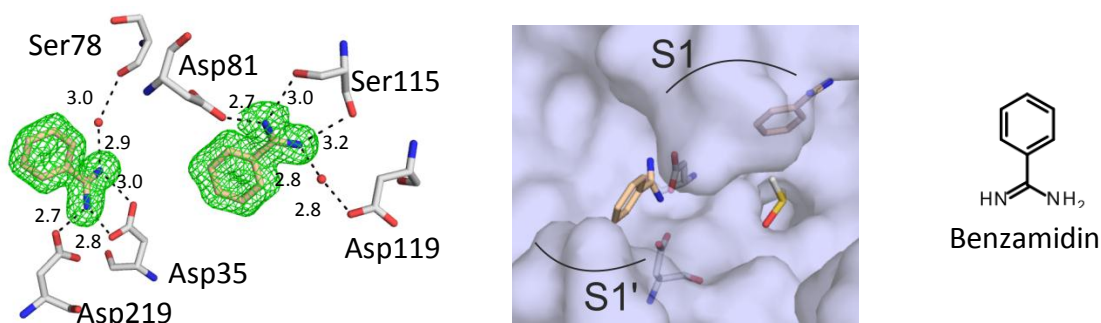


Abbildung 3.49: Bindungsmodus von Benzamidin in Endothiapepsin, Übersicht über die Position aller Liganden in der Bindetasche sowie die Strukturformel von Benzamidin. Im ersten Bild ist in grün die Differenzelektronendichte  $mF_o - DF_c$  bei 2.0 sigma dargestellt sowie die Längen der Wasserstoffbrückenbindungen in Å angegeben.

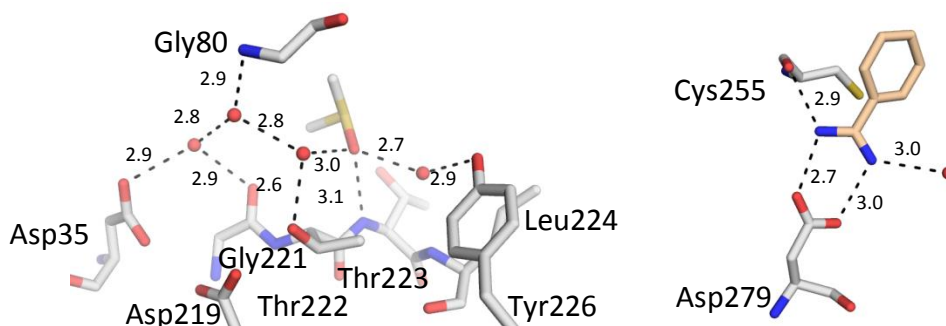


Abbildung 3.50: Links: Das DMSO in der Bindetasche ist in ein weitreichendes Wassernetzwerk eingebunden. Rechts: Bindemodus eines weiteren Benzamidins an der Oberfläche des Proteins

An der Oberfläche des Proteins befindet sich zusätzlich noch ein drittes Benzamidin (Abbildung 3.50 rechts). Dieses Benzamidin bildet Wasserstoffbrücken zu Cys255 und Asp279 sowie einem Wassermolekül des umgebenden Solvens aus. Dieses Wasser steht in Kontakt mit einem weiteren dem Solvens zugewandten Wassermolekül ohne jedoch in ein größeres Wassernetzwerk oder in die Kristallpackung involviert zu sein.



### 3.5.3 Bestimmung der Benzamidin-SAP2 Komplexstruktur

Endothiapepsin dient in dieser Studie lediglich als allgemeines Modellprotein für die pepsinähnlichen Aspartylproteasen. Um zu überprüfen, inwieweit der für Endothiapepsin gefundene Bindungsmodus auf andere Proteine dieser Familie übertragbar ist, wurde nachdem die Komplexstruktur von Benzamidin und Endothiapepsin erfolgreich bestimmt war, zusätzlich noch die Komplexstruktur von Benzamidin im Komplex mit SAP2 aufgenommen. Ein SAP2-Kristall wurde dazu zwei Tage einer Lösung mit 100 mM Benzamidin ausgesetzt und anschließend am Synchrotron vermessen. Dieser Datensatz erreichte ebenfalls eine gute Auflösung von 1.32 Å.

Auch in SAP2 konnten zwei Benzamidine in der Bindetasche identifiziert werden. Überraschenderweise findet sich dort zusätzlich noch ein Molekül S-MPD (4S-2-Methyl-2,4-Pentandiol) (Abbildung 3.51). Racemisches MPD war zu 40% in der verwendeten Lösung enthalten. Das an die katalytische Diade bindende Benzamidin bildet dieselben Wechselwirkungen wie in Endothiapepsin aus. Der hydrophobe Benzylring besetzt die S1'-Tasche während die Amidgruppe zwischen den Aspartaten zu liegen kommt. Einer der beiden Stickstoffe nimmt die Position des katalytischen Wassers ein und bildet sowohl zu Asp218 als auch zu Asp32 eine Wasserstoffbrücke aus. Der zweite Stickstoff adressiert sowohl den äußeren Sauerstoff von Asp32 wie auch über ein Wasser vermittelt den Carbonylsauerstoff von Gly83 der *Flap*-Region.

Das zweite Benzamidin befindet sich im Gegensatz zu Endothiapepsin nicht in der S1-sondern in der S2-Tasche in direkter Nachbarschaft zu dem ersten Benzamidin. Ein Amidinsauerstoff bildet zu dem Carbonylsauerstoff von Gly220 sowie zu dem Hydroxysauerstoff von Thr221 eine Wechselwirkung aus. Der zweite Stickstoff adressiert die Carboxygruppe des *Flap*-Aspartats und interagiert mit einer der Hydroxygruppen des MPD Moleküls, welches mit seinen hydrophoben Bestandteilen die S1-Tasche besetzt (Abbildung 3.52).

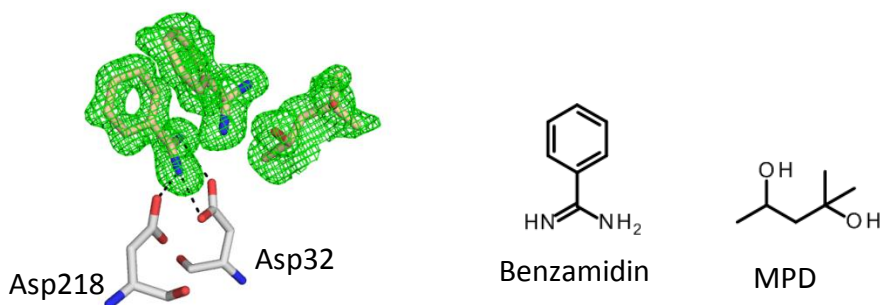


Abbildung 3.51: Links: Die drei in der Bindetasche gebundenen Liganden. In grün ist die Differenzdichte  $mF_o - DF_c$  bei 2.0 sigma wiedergegeben. Rechts: Strukturformeln von Benzamidin und MPD (2-Methyl-2,4-Pentandiol). MPD wurde als Racemat eingesetzt. In der Bindetasche findet sich das S-konfigurierte Molekül.

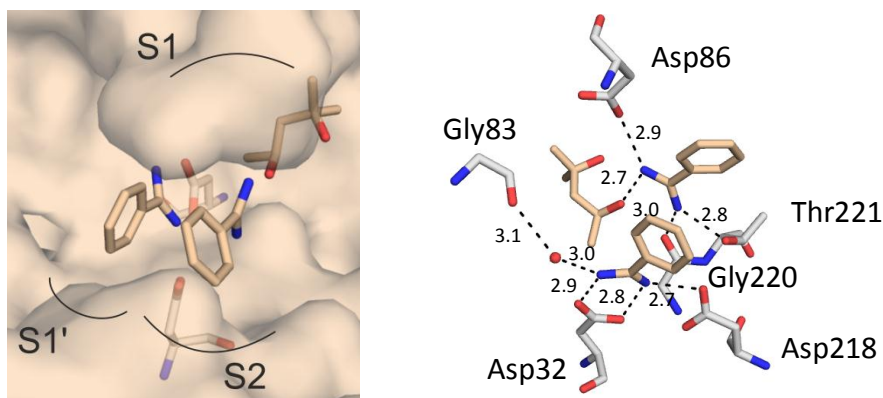


Abbildung 3.52: Überblick über die Lage der Liganden in der Bindetasche sowie deren detaillierter Bindemodus. Die Längen der Wasserstoffbrückenbindungen sind in Å angegeben.

### Kristallographische Tabelle

Inhibitor	Benzamidin	SB217	Benzamidin
Protein	EP	EP	SAP2
PDB Code	3PCZ	3T7P	3PVK
<b>Datensammlung und Prozessierung</b>			
Sammlungsort	SLS	SLS	SLS
$\lambda$ [Å]	1.000	1.000	1.000
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>
Einheitszellkonstanten			
a [Å]	45.5	45.4	49.4
b [Å]	72.8	73.1	63.6
c [Å]	52.6	52.9	98.4
$\beta$ [°]	109.9	109.6	49.4
Auflösung [Å]	40.0-1.50	40 - 1.35	40.0-1.27
Höchste Auflösungsschale	1.53-1.50	1.37 - 1.35	1.29-1.27
Anzahl einzelner Reflexe	51272	70171	79920
R <sub>sym</sub> [%] <sup>a</sup>	8.0 (49.2)	4.5 (17.8)	7.1 (41.8)
Vollständigkeit [%] <sup>a</sup>	98.5 (87.8)	98.4 (81.6)	97.0 (82.7)
Redundanz <sup>a</sup>	3.6 (2.8)	3.6 (2.3)	6.8 (3.7)
I/ $\sigma$ <sup>a</sup>	15.5 (2.4)	27.3 (5.1)	26.2 (2.9)
<b>Verfeinerung</b>			
Verwendetes Programm	SHELXL	PHENIX	PHENIX
Anisotrop verfeinert	Ja	Nein	Nein
Letzter R <sub>free</sub> <sup>b</sup>	18.2	16.9	18.4
Letzter R <sub>work</sub> <sup>b</sup>	12.9	15.3	16.8
Anzahl Wassermoleküle	239	425	332
Ramachandran Diagramm			
Bevorzugte Regionen (%)	93.9	93.9	89.7
Erlaubte Regionen (%)	6.1	6.1	9.3
Erweiterte erlaubte Regionen(%)	0	0	0.7
Verbotene Regionen (%)	0	0	0.3
Durchschnittliche B-Werte (Å <sup>2</sup> )			
Protein Atome	14.1	9.2	11.1

Wassermoleküle	27.3	22.2	22.7
Inhibitor	18.5	25.9	17.8
Andere Liganden <sup>c</sup>	20.2	26.6	16.8
RMSD Bindungslängen [Å]	0.010	0.005	0.007
RMSD Bindungswinkel [°]	2.1	1.1	1.1

<sup>a</sup> Wert in Klammern bezieht sich auf die höchste Auflösungsschale

<sup>b</sup> die angegebenen R-Werte beziehen sich jeweils auf die gesamten Daten

<sup>c</sup> andere Liganden sind Glycerol und/oder DMSO (im Falle der EP Strukturen) und Zink und Imidazol im Falle der SAP2 (MPD wurde als Inhibitor berücksichtigt)

Tabelle 3.15: Kristallographische Tabelle

In der SAP2-Komplexstruktur befindet sich Gln11 in der verbotenen Zone des Ramachandran Plots. Diese Aminosäure befindet sich an der Spitze einer klassischen  $\gamma$ -Wendung und wurde auch schon in früheren Strukturen in dieser Geometrie beschrieben.<sup>[119, 120]</sup>

### 3.5.4 Diskussion

Die drei hier vorgestellten Komplexstrukturen beweisen, dass mit Endothiapepsin auch kleine Moleküle mit niedriger Affinität erfolgreich kristallisiert werden können. Darüber hinaus bieten die Strukturen interessante Ausgangspunkte für ein fragmentbasiertes Wirkstoffdesign. Im Folgenden sollen die Strukturen vor diesem Hintergrund genauer diskutiert werden.

#### *Die Komplexstruktur von SB217*

Die Struktur von Endothiapepsin im Komplex mit SB217 zeigt erstmals den Bindemodus eines Hydrazons mit einer pepsinähnlichen Aspartylprotease. Während die meisten Aspartylproteaseinhibitoren direkt an die katalytischen Aspartate binden, findet sich hier eine über das katalytische Wasser vermittelte Interaktion. Das Interesse an dieser Substanzklasse zeigt sich in der erst kürzlich veröffentlichten Arbeit von McKay et al., die unter anderem verschiedene Hydrazone als wirksame Plasmepsin-Inhibitoren vorstellen.<sup>[125]</sup>

Anhand der Komplexstruktur von SB217 bieten sich vielfältige Möglichkeiten den Liganden an Endothiapepsin anzupassen und somit die Affinität weiter zu steigern. In Abbildung 3.53 sind verschiedene Modifikationen vorgestellt die im Rahmen eines fragmentbasierten Wirkstoffdesigns ausprobiert werden könnten. Die Abbildungen wurden ohne anschließende Energieminimierung durch Modifikation des Liganden mit dem Programm Pymol erzeugt und dienen lediglich der Veranschaulichung der verschiedenen Ansätze. Eine Hydroxygruppe in der Metaposition des Phenylrings in

der S1-Tasche könnte eine Wechselwirkung zu Ser83 ausbilden. Ein Pyridinstickstoff in der Orthoposition desselben Phenyrings ist möglicherweise in der Lage mit Asp81 eine Wasserstoffbrücke einzugehen. Auch der Naphtholrest in der S2'-Tasche bietet eine interessante Möglichkeit zur Optimierung. So könnte eine zusätzliche Amino- oder Hydroxyfunktion eine Wechselwirkung zu dem Carbonylsauerstoff von Leu133 ausbilden. Eine Erweiterung des Liganden um einen zusätzlichen Substituenten ist ebenfalls möglich. So könnte an die Position der Aminogruppe ein größerer Rest, welcher die S2-Tasche adressiert, angefügt werden. Ein Stickstoff über eine Methylengruppe vom ursprünglichen Grundgerüst getrennt, bietet hierbei die Möglichkeit eine Interaktion zu der Hydroxygruppe von Thr222 eingehen.

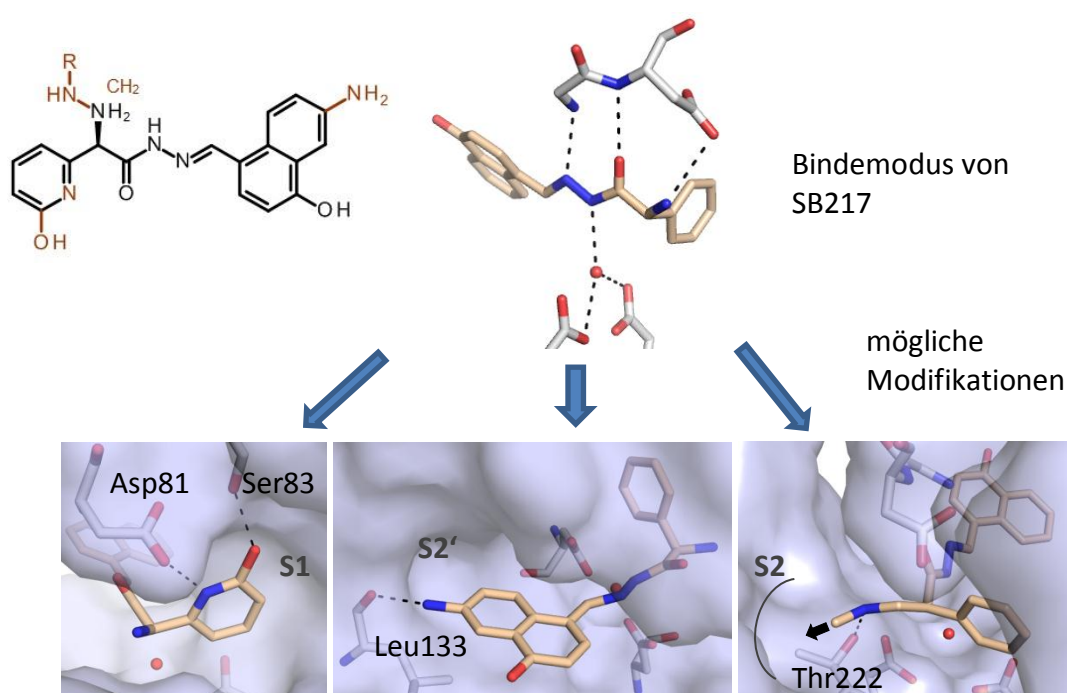


Abbildung 3.53: Der Bindemodus von SB217 sowie sich daraus ergebende mögliche Modifikationen des Liganden. Links ist die chemische Formel des ursprünglichen Liganden (schwarze Schrift) mit den vorgeschlagenen Modifikationen (rote Schrift) dargestellt.

Die Struktur von SB217 im Komplex mit Endothiapepsin bietet somit eine vielversprechende Grundlage, um dieses Grundgerüst zu einem potenten Inhibitor für pepsinähnliche Aspartylproteasen auszubauen.

#### *Die beiden Benzamidin-Strukturen*

Als sehr kleines Molekül mit einem Molekulargewicht von lediglich 120 g/mol ist Benzamidin geeignet, um bevorzugte Bindepositionen innerhalb eines Proteins

aufzuzeigen und kann somit auch als Sonde bezeichnet werden. Um die Relevanz der so gefundenen Bindestellen zu belegen ist es besonders interessant, inwieweit die gefundenen Positionen tatsächliche in größeren, hochaffinen Liganden aufgegriffen werden. Es bietet sich an die beiden Benzamidin-Komplexstrukturen mit den Komplexstrukturen der im letzten Kapitel vorgestellten HIV-Protease-Inhibitoren zu vergleichen. Abbildung 3.54 zeigt Überlagerungen der Ritonavir- (A) und Saquinavir- (B) Strukturen von EP mit der Benzamidin Struktur von Endothiapepsin, der Ritonavir Struktur der SAP2 mit der Benzamidin Struktur von SAP2 (C) sowie die Überlagerung an der katalytischen Diade aller drei Endothiapepsin Strukturen (D).

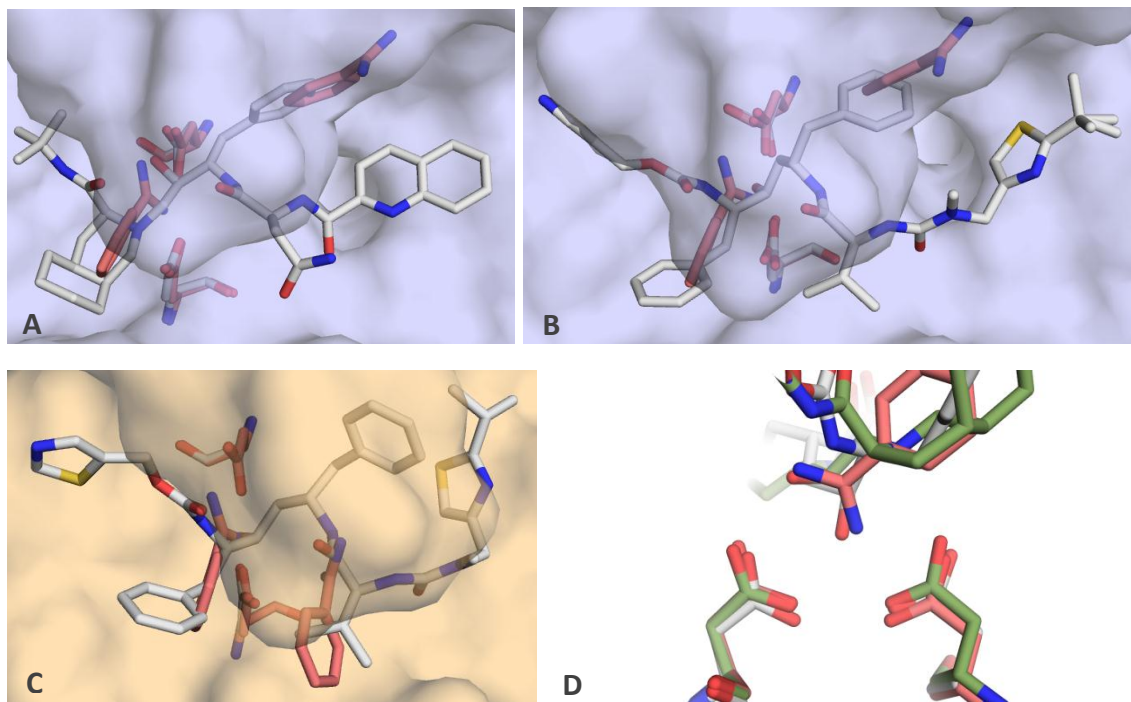


Abbildung 3.54: Überlagerungen der Benzamidin-Komplexstrukturen mit den entsprechenden Komplexen von EP und Sap2 mit Ritonavir bzw. Saquinavir. Die dargestellten Proteinoberflächen (blau: EP, orange: SAP2) beziehen sich jeweils auf die Ritonavir bzw. Saquinavir Komplexstruktur. **A:** Überlagerung der Saquinavir-EP Komplexstruktur (Kohlenstoffatome weiß) mit der Benzamidin-EP-Komplexstruktur (Kohlenstoffatome rot). **B:** Überlagerung der Ritonavir-EP Komplexstruktur (Kohlenstoffatome weiß) mit der Benzamidin-EP-Komplexstruktur (Kohlenstoffatome rot). **C:** Überlagerung der Ritonavir-SAP2 Komplexstruktur (Kohlenstoffatome weiß) mit der Benzamidin-SAP2 Komplexstruktur (Kohlenstoffatome rot). **D:** Überlagerung der Benzamidin-EP Komplexstruktur (Kohlenstoffatome rot) mit der Ritonavir-EP Komplexstruktur (Kohlenstoffatome weiß) und der Saquinavir-EP Komplexstruktur (Kohlenstoffatome grün).

Der Vergleich der Strukturen zeigt, dass die Benzamide jeweils an den gleichen Stellen zu liegen kommen, wie die hydrophoben Substituenten der Inhibitoren. Saquinavir besetzt in Endothiapepsin die S1- sowie die S1'-Tasche mit einem hydrophoben Rest, was mit den beiden Benzamiden, die mit ihrem hydrophoben Phenylring ebenfalls dort binden gut übereinstimmt (Abb 3.54 A). Ritonavir besetzt

neben der S1- und S1'-Tasche auch die S2-Tasche mit einem hydrophoben Rest. Während in Endothiapepsin die S1- und S1'-Tasche von den Benzamidinmolekülen besetzt sind, kommen die Benzamide in SAP2 in der S1- und S2-Tasche zu liegen (Abb 3.54 B,C). Somit finden sich auch im Falle von Ritonavir die hydrophoben Substituenten an den durch die Benzamide ausgezeichneten Positionen. Neben dem Vergleich der hydrophoben Anteile ist auch die Adressierung der katalytischen Diade von Interesse. Eine Überlagerung aller drei Endothiapepsin Strukturen (EP im Komplex mit Ritonavir, Saquinavir und Benzamidin, Abb. 3.54 D) zeigt das die beiden Stickstoffe der Amidgruppe an denselben Positionen zu liegen kommen, wie die Sauerstoffe der Hydroxygruppen der beiden größeren Inhibitoren. Während die Hydroxygruppe von Ritonavir deckungsgleich mit dem ersten Amidinstickstoff an der zentralen Position zwischen den beiden Aspartaten zu liegen kommt, adressiert die Hydroxygruppe des Saquinavirs ebenso wie der zweite Amidinstickstoff den äußeren Sauerstoff von Asp35. Somit sind die Interaktionen, die Benzamidin eingeht, offensichtlich auch für größere und affinere Liganden relevant.

Werden die beiden Benzamidinstrukturen direkt gegenübergestellt, stellt sich die Frage weshalb das zweite Benzamidin in SAP2 verglichen mit Endothiapepsin eine andere Position einnimmt, obwohl die lokale Umgebung der Bindestellen in beiden Proteinen prinzipiell vergleichbar ist. Ein relevanter Unterschied der beiden Strukturen ist das MPD Molekül, welches in SAP2 im Bereich der S1-Tasche gebunden hat. Es ist denkbar, dass die Anwesenheit des MPD den in der SAP2 gefundenen Bindungsmodus begünstigt. Da aber auch kleine auf den ersten Blick unbedeutende Unterschiede den Ausschlag für die eine oder andere Bindepotion geben können, lässt sich diese Frage ohne weitere Untersuchungen nicht beantworten.

### 3.5.5 Zusammenfassung

Anhand zweier Fragmente, SB217 und Benzamidin, konnte demonstriert werden, dass sowohl mit Endothiapepsin wie auch mit SAP2 erfolgreich Fragmente kristallisiert werden können. Da Fragmente bevorzugt Bindepotionen aufzeigen, sind sie für ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign von besonderem Interesse. Die Bindepotionen der Fragmente werden oftmals bei der Bindung größerer Liganden wiedergefunden. Auf diese Weise liefern Fragmente wertvolle Informationen für das Design potenter Inhibitoren. Die Struktur von Endothiapepsin im Komplex mit SB217 zeigt zudem erstmals den Bindemodus eines Hydrazons an die katalytischen Aspartate einer pepsinähnlichen Aspartylprotease. In der Bindetasche konnten zwei Inhibitormoleküle identifiziert werden, wobei eines der Moleküle zum Teil ungeordnet in das umgebende Solvens orientiert ist. Die katalytische Diade wird durch den Amidstickstoff des Hydrazons über ein Wasser vermittelt adressiert. Durch das kleine, verhältnismäßig

einfache Grundgerüst bietet der gefundene Bindemodus eine gute Grundlage den Liganden zu optimieren und somit durch ein fragmentbasiertes Wirkstoffdesign einen hochaffinen Inhibitor zu entwickeln. Benzamidin, welches aufgrund seiner kleinen Größe auch als Sonde betrachtet werden kann, wurde sowohl mit Endothiapepsin wie auch mit SAP2 kristallisiert. Auch hier binden in beiden Proteinen jeweils zwei Moleküle in der Bindetasche. Während ein Benzamidinmolekül mit seiner Amidgruppe die beiden Aspartate der katalytische Diade adressiert bindet das zweite Molekül im Falle von Endothiapepsin in der S1-Tasche und im Falle von SAP2 in der S2-Tasche. In der SAP2 konnte im Bereich der S1-Tasche zusätzlich ein MPD Molekül identifiziert werden, welches auch eine Wechselwirkung zu dem Benzamidin in der S2-Tasche eingeht. Es konnte gezeigt werden, dass die verschiedenen Positionen der Benzamidinmoleküle bevorzugte Bindebereiche aufzeigen, welche auch von größeren und affineren Liganden adressiert werden und somit für weitere Designprojekte wertvolle Informationen liefern. Darüber hinaus kann auch der Bindemodus so kleiner Moleküle wie Benzamidin (oder Phenol vgl. Kapitel 5) als Ausgangspunkt für ein erfolgreiches Fragment-basiertes Design dienen. Eine weitere Möglichkeit ist, das simultane Vorhandensein verschiedener Moleküle in der Bindetasche zu nutzen, um über das chemische Verknüpfen dieser Liganden einen neuen affineren Inhibitor zu entwickeln. Insbesondere die Benzamidin-SAP2 Komplexstruktur mit drei gebundenen Liganden würde sich hierfür anbieten.

Die Erfahrungen, die mit den hier vorgestellten Liganden gemacht wurden, bilden die Grundlage für das im folgenden Kapitel dargestellte Fragmentprojekt, indem systematisch eine ganze Fragmentbibliothek auf Endothiapepsin getestet wurde.

### 3.6 Untersuchung einer nicht auf der Dreierregel basierten Fragmentbibliothek mit Endothiapepsin

Die hier vorgestellten Ergebnisse wurden unter dem Titel „A small non-rule of 3 compatible fragment library provides high hit rate of endothiapepsin crystal structures with various fragment chemotypes“ in dem Journal of Medical Chemistry veröffentlicht.<sup>[92]</sup> Im Rahmen dieser Arbeit wurden der Assay auf Endothiapepsin sowie die Bestimmung der Kristallstrukturen durchgeführt. Das Design der vorgestellten Bibliothek wurde von Tobias Craan in Zusammenarbeit mit unseren industriellen Kooperationspartnern bewerkstelligt. Die Bestimmung der Wasserlöslichkeiten sowie der Reinheit der einzelnen Verbindungen wurde von unseren industriellen Kooperationspartnern übernommen.

Eine 364 Fragmente umfassende Bibliothek, welche nicht den Beschränkungen der gängigen Dreierregel folgt, wurde mit Endothiapepsin nach aktiven Verbindungen gefiltert. Dabei konnte mit 55 Verbindungen eine vergleichsweise hohe Trefferquote erzielt werden. Diese 55 Verbindungen wurden einer kristallographischen Untersuchung zugeführt und dabei elf Komplexstrukturen erhalten. Bemerkenswert sind die hohe chemische Diversität der Verbindungen und die vielfältigen zum Teil neuartigen Möglichkeiten die katalytische Diade zu adressieren. Da sieben der Fragmente, die eine Kristallstruktur geliefert haben, nicht mit der Dreierregel übereinstimmen, regt diese Untersuchung an einige Aspekte dieser Regel kritisch zu betrachten.

#### 3.6.1 Einleitung

Damit Wirkstoffe auch als Arzneistoffe erfolgreich sind, müssen diese neben einer ausreichenden Affinität zu ihrem Zielprotein weitere Kriterien, wie z.B. ausreichende (meist orale) Bioverfügbarkeit, erfüllen. Als früher Anhaltspunkt, ob eine Verbindung diesen Kriterien genügt wird oft Lipinskis Fünferregel verwendet.<sup>[12]</sup> Diese Regel gibt verschiedene physikochemische Eigenschaften an, welche ein Arzneistoff-ähnliches Molekül ausmachen. Die Fünferregel verlangt nicht mehr als fünf Wasserstoffbrücken Donoren, nicht mehr als zehn Wasserstoffbrücken Akzeptoren, eine maximale Molekülmasse von 500 g/mol sowie einen Octanol-Wasser Verteilungskoeffizienten (logP) von maximal fünf. Ähnliche Regeln wurden auch für Fragmente formuliert und wurden als Astexs Dreierregel bekannt.<sup>[13]</sup> Viele Grenzen der Fünferregel werden hier von fünf auf drei reduziert. So gibt die Dreierregel ein Molekulargewicht von weniger als 300 g/mol vor, weniger als jeweils drei Wasserstoffbrücken Donoren und Akzeptoren, ein logP von maximal drei, maximal drei freidrehbare Bindungen und eine polare Oberfläche von maximal 60 Å<sup>2</sup>. Viele Anbieter kommerzieller Fragment-



bibliotheken orientieren sich an dieser Regel und wählen Ihre Fragmente dementsprechend aus.

Ein Ziel dieses Projekts ist zu untersuchen, ob diese Regel zu streng ist, um eine Bibliothek mit Fragmenten aufzubauen, die auch genügend Raum für spätere schrittweise chemische Veränderungen aufweisen. Um Fragmente erfolgreich zu größeren Liganden auszubauen oder verschiedene Fragmente miteinander zu verknüpfen, ist eine ausreichende Anzahl funktioneller Gruppen erforderlich, die oft Eigenschaften als Wasserstoffbrücken-Donoren oder -Akzeptoren aufweisen. Dementsprechend haben wir eine Fragmentbibliothek aufgebaut, die sich nicht streng an der Dreierregel orientiert, Fragmente enthält die späteren chemischen Modifikationen zugänglich sind und sich für eine kristallographische Untersuchung eignet. Um diese Bibliothek zu validieren wurde sie für Endothiapepsin getestet. Neben neuen Fragmenten, die an Endothiapepsin binden waren wir insbesondere auch daran interessiert, inwieweit die identifizierten Fragmente der Dreierregel entsprechen.

### 3.6.2 Design der Bibliothek

Initial wurde bei verschiedenen chemischen Lieferanten (ASINEX, ChemBridge, MayBridge, InterBio Screen, LifeChemicals, Enamine, Specs, Vitas M Laboratory) angefragt, welche Verbindungen mit weniger als 20 Nichtwasserstoffatomen, wobei lediglich C, N, O, F, Cl, Br und P enthalten sein durften, und einer Verfügbarkeit von mindestens 100 mg erhältlich sind. Im Frühling 2009 sind so 238.224 Verbindungen zusammengekommen. Da die Bibliothek kristallographisch untersucht werden sollte wurden Fragmente mit starken Röntgenstreuern wie Brom als vorteilhaft angesehen. Da diese elektronenreichen Atome ein hohes Molekulargewicht aufweisen, haben wir die Größe unserer Fragmente nicht nach dem Molekulargewicht sondern anhand der Anzahl der Nichtwasserstoffatome begrenzt. Demnach sollten unsere Fragmente zwischen acht und 20 Nichtwasserstoffatome aufweisen. Das Molekulargewicht der Verbindungen der endgültigen Bibliothek schwankt zwischen 122 g/mol und 359 g/mol mit einem Mittelwert von 224 g/mol (Abbildung 3.55, Tabelle 3.16).

Im nächsten Schritt wurden unerwünschte funktionelle Gruppen herausgefiltert um potentiell toxische, unerwünschte oder chemisch instabile Gruppen auszuschließen. Die angewandten Filter sind dabei ähnlich denen, die von Baurin et al. entwickelt wurden.<sup>[126]</sup>

Alle physiko-chemischen Parameter wurden mit MOE errechnet, wobei physiologische pH Bedingungen sowie Standard-Protonierungen angenommen wurden.<sup>[127]</sup> Da die Anzahl frei drehbarer Bindungen nicht eingeschränkt wurde, variiert diese in der zusammengestellten Bibliothek zwischen null und sieben mit einem Mittelwert von 1.7

(Tabelle 3.16). Der logP (berechnet als clogP(o/w),) wurde auf maximal drei begrenzt wobei für einige chemische Motive dieser Wert auf 5.4 erweitert wurde. Dadurch variiert die berechnete Lipophile zwischen 1.3 und 5.4 mit einem Mittelwert von 1.6. In Bezug auf die Wasserstoffbrücken-Akzeptoren erlaubt die Dreierregel lediglich drei Akzeptoren während die Fünferregel den doppelten Wert, also zehn Akzeptoren erlaubt. Wir haben das Schema der Fünferregel auf die Dreierregel übertragen und maximal sechs Wasserstoffbrücken-Akzeptoren zugelassen. Lediglich in speziellen Fällen wurden Fragmente berücksichtigt welche diese Grenze überschreiten. In der fertigen Bibliothek finden sich so Fragmente mit zwischen ein und sieben Wasserstoffbrücken-Akzeptoren mit einem Mittelwert von 3.7. Die Wasserstoffbrücken-Donoren wurden in Übereinstimmung mit der Dreierregel auf maximal drei beschränkt. Nur einige sehr wenige Fragmente weisen mehr Wasserstoffbrücken-Donoren auf, so dass dieser Wert letztendlich zwischen null und vier variiert bei einem Mittelwert von 1.3. Für die totale polare Oberfläche wurde der Grenzwert von 60 Å<sup>2</sup> auf 80 Å<sup>2</sup> angehoben, wobei wiederum für einige Grundgerüste Ausnahmen zugelassen wurden. In der fertigen Bibliothek liegt der Wert für die totale polare Oberfläche zwischen 15 Å<sup>2</sup> und 126 Å<sup>2</sup> mit einem Mittelwert von 52 Å<sup>2</sup>.

	min	max	Mittelwert
Anzahl nicht H-Atome	8	20	15
Molekulargewicht [g/mol]	122	359	224
Lipinski Donoren	0	4	1.3
Lipinski Akzeptoren	1	7	3,7
logP	-1.3	5.4	1.6
Freidrehbare Bindungen	0	7	1.7
TPSA [Å <sup>2</sup> ]	15	126	52

Tabelle 3.16: Physiko-chemische Parameter der Fragmentbibliothek

Die so gefilterten Fragmente wurden in Gruppen zusammengefasst, manuell priorisiert und visuell inspiziert um eine Akkumulation ähnlicher Chemotypen zu verhindern und eine ausreichenden Variation chemischer Grundgerüste zu erreichen. Für jedes Fragment wurde mindestens ein Ringssystem vorausgesetzt. Die überwiegende Mehrheit zeigt ein oder zwei Ringsysteme (oft fusioniert) und etwa 20 % weisen drei Ringsysteme auf.

Betrachtet man die 364 letztendlich ausgewählten Fragmente im Detail, so sind 141 Fragmente in Übereinstimmung mit der Dreierregel während 223 in wenigstens einem

Kriterium von dieser abweichen. In Bezug auf die Chiralität der Verbindungen weisen 55 wenigstens ein stereogenes Zentrum auf, wobei chirale Verbindungen in der Regel als Racemat gekauft wurden. Die experimentelle Löslichkeit der Fragmente wurde für 76 % auf über 1 mM bestimmt. In Bezug auf die oberen und unteren Grenzen der Dreierregel haben wir den Bereich aller Kriterien nach oben überschritten, liegen allerdings mit dem Mittelwert in allen Fällen innerhalb dieser Grenzen. Lediglich die mittlere Anzahl der Wasserstoffbrücken-Akzeptoren liegt klar außerhalb des Bereich, der von der Dreierregel vorgegeben wird.

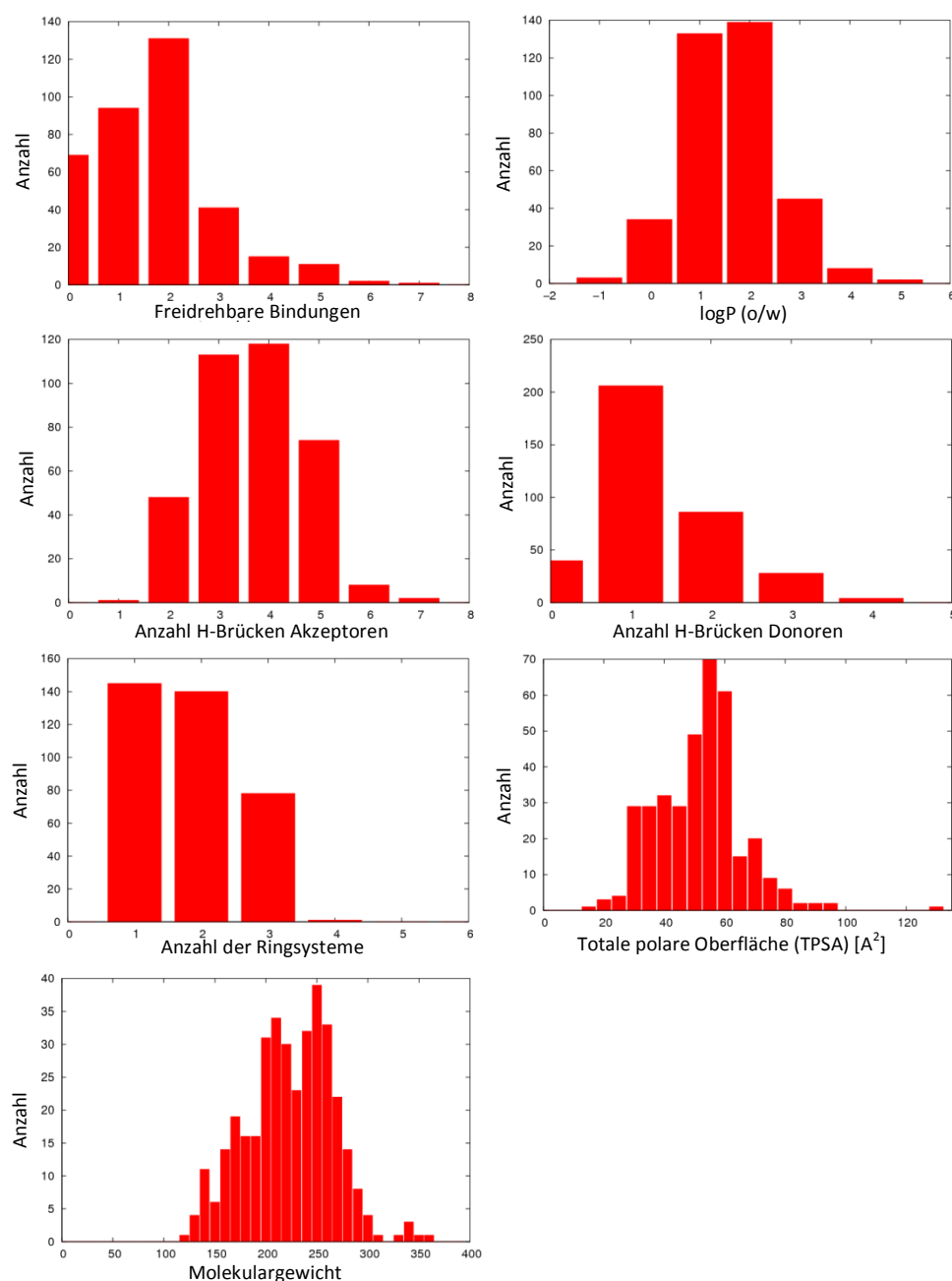


Abbildung 3.55: Verteilung der physikochemischen Parameter sowie strukturellen Eigenschaften innerhalb der zusammengestellten Fragmentbibliothek

### 3.6.3 Validierung der Bibliothek mit Endothiapepsin

Um die Tauglichkeit unserer Bibliothek für Screening-Zwecke zu überprüfen wurden alle Fragmente mit Endothiapepsin in einem fluoreszenzbasierten Assay getestet. Dabei wurden alle Verbindungen in einer Konzentration von 1 mmol/L eingesetzt. Aufgrund unzureichender Löslichkeit unter den Assaybedingungen wurden 14 Fragmente ausgeschlossen und weitere 18 Verbindungen konnten lediglich bei 500 µmol/L getestet werden. Zusätzlich konnten 17 Fragmente aufgrund ihrer Selbstfluoreszenz nicht vermessen werden. Alle Fragmente, die die Proteinfunktion zu mindestens 40 % inhibierten, wurden als Hits betrachtet. Dies führte zu 55 Verbindungen, welche einem sich anschließenden kristallographischen Screen zugeführt wurden. Auf diese Weise wurden insgesamt elf Komplexstrukturen erhalten. Fragmente wurden dazu jeweils in Zweiergemischen in Kristalle von unkomplexiertem Endothiapepsin eindiffundiert. Prinzipiell führt das Verwenden von Cocktails bestehend aus mehreren Verbindungen zu einer Zeitersparnis und bietet die Möglichkeit ein kooperatives Binden unterschiedlicher Fragmente zu beobachten. Demgegenüber steht das Risiko das mehrere Verbindungen um eine Bindeposition konkurrieren und sich die maximale einsetzbare Ligandkonzentration reduziert. Deshalb und da wir erwarteten, dass die Mehrheit der Fragmente an die katalytische Diade bindet, haben wir uns für Mixturen aus lediglich zwei Verbindungen entschieden. In dem Fall, dass ein Fragment dieser Mixtur in der Kristallstruktur aufzufinden war, wurde die andere Verbindung nochmals dem kristallographischen *Screening* zugeführt. In zwei Fällen (255 und 148) wurde die Verbindung noch einmal alleine ohne eine zweite Verbindung eindiffundiert, da die Differenzdichte nicht ausreichend war um den Liganden zweifelsfrei zu platzieren. In beiden Fällen verbesserte sich die Dichte dadurch signifikant. Fragment 109 wurde aus praktischen Gründen einzeln eindiffundiert. Ein simultanes Binden zweier Fragmente wurde nie beobachtet. In vielen Strukturen wurde neben den gebundenen Liganden noch weitere nicht zuordbare Elektronendichte, auch in der Bindetasche, beobachtet. Dies ist wahrscheinlich auf unspezifische Bindungen aufgrund der hohen eingesetzten Ligandkonzentrationen zurückzuführen.

Die Hit-Rate des fluoreszenz-basierten Assay ist mit 55 Hits aus einer Bibliothek mit 364 Fragmenten bemerkenswert hoch. Die aus diesen 55 Hits anschließend erhaltenen elf Komplexstrukturen legen nahe, dass unsere Bibliothek sowohl effizient zusammengestellt wurde, als auch der fluoreszenzbasierte Assay einen guten Filter darstellt. Tabelle 3.17 zeigt das Assayergebnis der 55 Hits. Eine Liste mit den Ergebnissen aller Verbindungen findet sich im Anhang. Die Inhibition dieser 55 Verbindungen reicht von 42 % bis zu 100 %, wobei 40 % als Grenze gesetzt wurde um ein Fragment als Hit zu akzeptieren. Die elf Fragmente, von denen eine Kristallstruktur gelang, sind markiert. Die Strukturformeln der erfolgreichen Fragmente sind in

Abbildung 3.56 dargestellt. Die ermittelte prozentuale Inhibition im Assay korreliert interessanterweise nicht mit der Wahrscheinlichkeit, dass die Verbindung in den Kristall eindiffundiert und anschließend eine Komplexstruktur liefert. So waren wir nicht in der Lage eine Komplexstruktur mit den acht Fragmenten welche eine vollständige Inhibition zeigten zu erhalten. Auf der anderen Seite konnten wir Fragmente mit dem Protein kristallisieren, die lediglich eine Inhibition von weniger als 50 % zeigten.

ID	% Inhibition	ID	% Inhibition	ID	% Inhibition
149	100	297	78	201	51
177	100 *	186	76	065	50
178	100	333	76	<b>291</b>	<b>50</b>
236	100	175	75	<b>041</b>	<b>49</b>
238	100	301	75	088	47
042	99	040	73	137	47
064	99	<b>063</b>	<b>66</b>	188	47
017	97	252	64	261	47
<b>306</b>	<b>93</b>	224	63	051	46
003	92	159	60	141	46
168	92	183	60	140	45
<b>005</b>	<b>89</b>	335	60	<b>216</b>	<b>45</b>
083	89	134	57	295	44
<b>109</b>	<b>89</b>	176	55	362	43
<b>284</b>	<b>87</b>	192	55 *	171	42
<b>255</b>	<b>84</b>	266	54 *		
<b>290</b>	<b>84</b>	267	54		
142	80	308	53		
161	80	222	52		
093	79	<b>148</b>	<b>51</b>		

Tabelle 3.17: Assayergebniss der 55 Verbindungen welche im Assay als Hit aufgefallen sind. Werte welche mit einem \* markiert sind, wurden bei 500µmol/L gemessen. Alle anderen wurden bei 1 mmol/L gemessen. Die Fragmente welche anschließend eine Kristallstruktur geliefert haben sind grau hinterlegt.

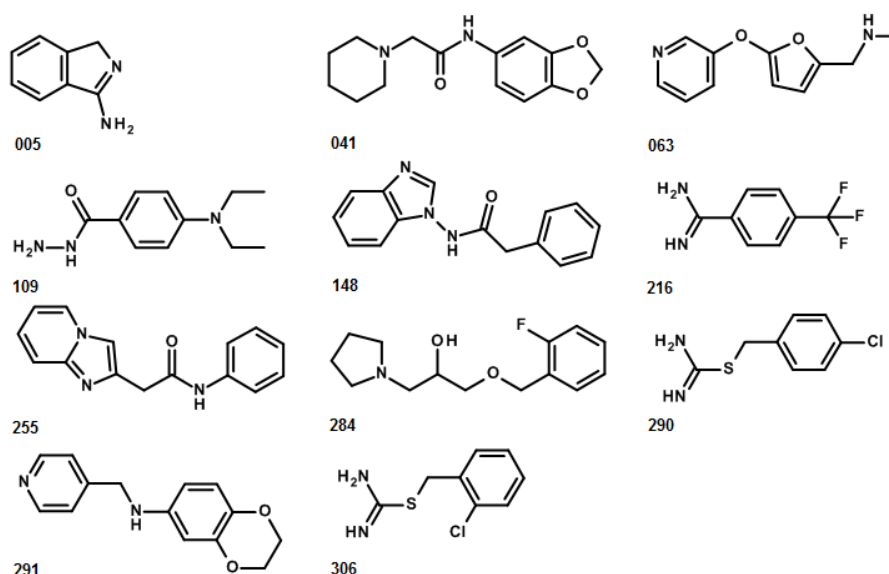


Abbildung 3.56 Strukturformeln der 11 Fragmente von welchen eine Kristallstruktur gelungen ist

Um aussagekräftige Parameter zu identifizieren, welche mit einem Eindiffundieren der Verbindung in den Kristall mit anschließender erfolgreicher Strukturbestimmung korrelieren, haben wir die kristallographisch charakterisierten Fragmente genauer untersucht und mit der für die Auswahl von Fragmenten oft angewandten Dreierregel verglichen. Tabelle 3.18 listet die physiko-chemischen Parameter dieser Verbindungen. Das Molekulargewicht variiert von 168 g/mol bis 262 g/mol, was ebenso wie die Anzahl der Donoren, die zwischen eins und drei liegt, der Dreierregel entspricht. Bemerkenswerterweise zeigen die Wasserstoffbrücken-Akzeptoren ein anderes Bild. So weisen mit sechs der elf Hits die Mehrzahl der erfolgreichen Fragmente vier oder mehr Akzeptoren auf. Lediglich fünf Fragmente zeigen zwischen ein und drei Akzeptoren und entsprechen damit der Dreierregel. Interessanterweise nutzen sechs der elf Hits alle ihre Wasserstoffbrücken-Akzeptoren um mit dem Protein zu interagieren. Der berechnete logP ist in den meisten Fällen kleiner drei und damit in Übereinstimmung mit der Dreierregel. Nur ein Fragment weicht mit einem Wert von 3.3 ein wenig ab. Die freidrehbaren Bindungen variieren von null bis sechs. Die Mehrheit weist weniger als drei freidrehbare Bindungen auf und lediglich zwei Fragmente weichen mit vier und sechs drehbaren Bindungen ab. Die totale polare Oberfläche befindet sich in allen Fällen unterhalb  $60 \text{ \AA}^2$  und befindet sich damit vollständig innerhalb der Grenzen der Dreierregel.

Zusammenfassend verletzen sieben der elf Fragmente, die eine Kristallstruktur geliefert haben, die Dreierregel in mindestens einem Kriterium.

ID	Nicht H- Atome	Gewicht [g/mol]	Lipinski Donor	Lipinski Akzeptor	logP	Freidrehbare Bindungen	TPSA [Å <sup>2</sup> ]
005	10	169	2	2	2.2	0	38.4
041	19	262	1	5	1.6	3	50.8
063	15	204	1	4	1.0	4	47.3
109	15	207	3	4	1.0	2	58.4
148	19	251	1	4	2.2	2	46.9
216	13	261	3	2	3.3	1	49.9
255	19	251	1	4	1.8	3	46.9
284	18	253	1	3	2.0	6	32.7
290	12	201	3	2	2.9	2	49.9
291	18	242	1	4	1.7	2	43.4
306	12	201	3	2	2.9	2	49.9

Tabelle 3.18: Die physiko-chemischen Parameter der 11 erfolgreichen Fragmente.

Die Löslichkeit wird als eine kritische Eigenschaft diskutiert.<sup>[34]</sup> Um zu überprüfen, inwieweit die berechnete mit der tatsächlichen Löslichkeit übereinstimmt, haben wir die Löslichkeit unserer Fragmente in einem wässrigen Puffer bei pH 7.4 bestimmt. Während des Designs der Fragmentbibliothek wurden verschiedene Computermethoden angewendet, um Fragmente mit einer hohen erwarteten Löslichkeit auszuwählen.<sup>[128, 129]</sup> Der wichtigste Parameter, um diese vorherzusagen, war der logP, der von -1.3 bis 5.4 variierte mit einem Mittelwert von 1.6 (Tabelle 3.16). Die gemessenen Löslichkeiten sind in Tabelle 3.19 präsentiert. Insgesamt 36 Fragmente konnten aufgrund ihrer Selbstfluoreszenz nicht vermessen werden. Mit 76 % zeigt die Mehrheit der Fragmente eine gute Löslichkeit von größer als 1 mmol/L, was auf eine recht erfolgreiche computergestützte Vorhersage hinweist. Um die gefundenen kristallographischen Hits weiter zu charakterisieren, haben wir die Löslichkeit dieser Verbindungen zum einen mit der Löslichkeit der Assay-Hits und zum anderen mit der Löslichkeit aller Fragmente der Bibliothek verglichen. Wie in Tabelle 3.19 zu sehen ist, variiert die Löslichkeit der Assay-Hits über die gesamte Spannbreite mit einer kleinen Tendenz hin zu einer besseren Löslichkeit. Alle Fragmente, die erfolgreich in einen Kristall eindiffundiert sind, zeigen eine Löslichkeit besser als 1.5 mmol/L. Diese Beobachtung legt nahe, dass besser lösliche Fragmente mit einer höheren Wahrscheinlichkeit als Assay-Hits auffallen. Besonders aber scheint für die Fähigkeit, erfolgreich eine Kristallstruktur zu liefern, neben einer guten Inhibition des Proteins, eine ausreichende Löslichkeit ein wichtiger Faktor zu sein.

	Alle (364)	Hits (55)	Struktur (11)
N.D.	10%	2%	0%
0	1%	0%	0%
0 - 0.5 mM	6%	2%	0%
0.5 - 1 mM	7%	2%	0%
1 - 1.5 mM	10%	14%	0%
1.5 - 2 mM	38%	53%	64%
> 2 mM	28%	27%	36%

Tabelle 3.19: Löslichkeitsdaten für die gesamte Bibliothek (erste Spalte), die Assay-Hits (mittlere Spalte) sowie für die Fragmente welche eine Kristallstruktur geliefert haben (letzte Spalte). N.D. (engl.: not determined) bezeichnet die Fragmente deren Löslichkeit nicht bestimmt werden konnte.

### 3.6.4 Analyse der Kristallstrukturen

Insgesamt wurden elf Kristallstrukturen von Endothiapepsin im Komplex mit einem Fragment erhalten, wobei die Auflösung zwischen 1.25 und 1.90 Å variiert. In allen Fällen zeigen die Fragmente eine Besetzung von mindestens 90 % und konnten anhand der Differenzdichte eindeutig platziert werden. Die Verbindungen weisen vielfältige Bindungsmoden auf, die sich in drei Kategorien unterteilen lassen: Direkte Bindung an die katalytischen Aspartate, Bindung an die beiden Aspartate über ein Wassermolekül vermittelt sowie keine Interaktion mit der katalytischen Diade.

Eine direkte Bindung an die katalytischen Aspartate ist mit sieben beobachteten Fällen das häufigste Motiv (Abbildung 3.57). Fragment 109 adressiert die beiden katalytischen Aspartate über den terminalen Stickstoff seiner HCarbonsäurehydrazid-Gruppe. Der endständige Stickstoff interagiert mit beiden Aspartaten sowie mit einem Wassermolekül über das eine Interaktion zu Gly37 im vorderen Teil der S1'-Tasche vermittelt wird. Der größte Teil des Inhibitor Grundgerüsts ist in Richtung der S1-Tasche orientiert. Das Fragment ist zu 90 % besetzt und zeigt einige Unordnung im Bereich der beiden endständigen Ethylsubstituenten. Zusätzlich befindet sich ein DMSO Molekül im vorderen Teil der S4-Tasche und bildet dort eine Wechselwirkung zu Thr223 aus (nicht im Bild).

Fragment 005 bindet an die katalytische Diade indem es seine exozyklische Aminogruppe zwischen beide Aspartate platziert. Der endozyklische Stickstoff des fünfgliedrigen Rings bildet dabei eine Wasserstoffbrücke zu Thr222 der S2-Tasche aus. Der fusionierte Phenylring, der in der S1-Tasche platziert ist, bildet eine  $\pi$ - $\pi$



Wechselwirkung zu Tyr79 aus. Ein Grundgerüst mit einer ähnlichen Topologie wurde bereits als Ligand für die  $\beta$ -Sekretase beschrieben.<sup>[130]</sup>

Obwohl die Fragmente 148 und 255 chemisch sehr ähnlich sind, zeigen ihre Bindungsmoden interessante Unterschiede. So interagiert 148 lediglich mit einem der beiden katalytischen Aspartate (Asp35). Zusätzlich bildet dieses Fragment eine Wasserstoffbrücke sowohl zu Thr222 als auch zu Gly221 aus. Über den Carbonylsauerstoff der Amidgruppe wird zudem eine Wasserstoffbrücke zu der NH Gruppe von Gly80 ausgebildet. Die Benzimidazole Gruppe besetzt die S1-Tasche während der Phenylring am gegenüberliegenden Ende der S2-Tasche zugewendet ist. Im Gegensatz zu 148 bindet 255 über der katalytischen Diade und bildet eine Wasserstoffbrücke zu beiden Aspartaten aus. Eine weitere Wasserstoffbrücke wird über den Carbonylsauerstoff zu Gly80 der *Flap*-Region ausgebildet. Das größere fusionierte 5-6-Ringsystem besetzt die S1-Tasche ähnlich dem Bindemodus von 148. Während 148 allerdings die S2-Tasche adressiert, ist in diesem Fall der Phenylring in Richtung der S1'-Tasche orientiert.

Die Fragmente 216, 306 und 290 bilden drei höchstwahrscheinlich salzartige Wasserstoffbrücken zu der katalytischen Diade indem sie Ihre Amidgruppe zwischen die beiden Aspartate platzieren. In allen Fällen wird eine doppelte Wasserstoffbrücke zu Asp35 bevorzugt während Asp219 lediglich mit einer Wasserstoffbrücke adressiert wird. Interessanterweise wurde für die  $\beta$ -Sekretase ein Komplex mit einem 306 und 290 ähnlichem Derivat beobachtet indem die Amidgruppe die beiden Aspartate in umgekehrter Orientierung adressiert (PDB-Code: 3KMX).<sup>[33]</sup> Die aromatischen Kerne besetzen in allen drei Strukturen die S1'-Tasche. 306 und 290 variieren lediglich in der Position des Chlorsubstituenten. Das in 290 in para-Position befindliche Chlor zeigt ins umgebende Solvens während die ortho-Substitution in 306 eine schwache Interaktion zu Phe194 erlaubt. Das Chlor zeigt hierbei mit einer Entfernung von etwa 4 Å auf die Ringebene von Phe194, wobei die Geometrie etwas von dem idealen Interaktionsmuster von Chloratomen mit Aromaten abweicht.<sup>[131]</sup> In der Struktur von 216 wurde in der Bindetasche ein zusätzliches DMSO an exakt derselben Stelle wie in der Komplexstruktur mit 109 gefunden.

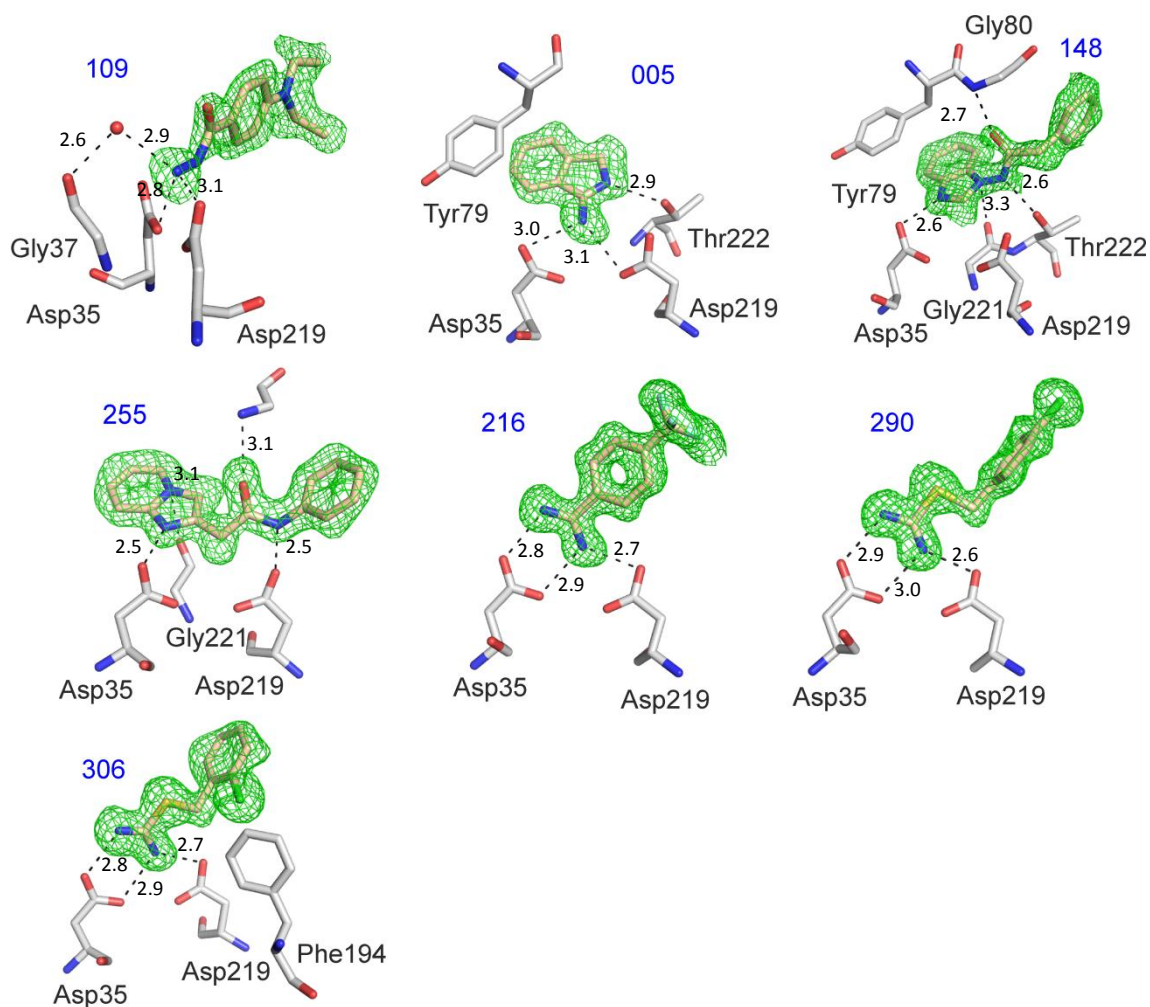


Abbildung 3.57: die sieben Komplexstrukturen in denen das Fragment direkt an die katalytischen Aspartate gebunden hat. In grün ist die Fo-Fc Dichte bei  $2\sigma$  gezeigt.

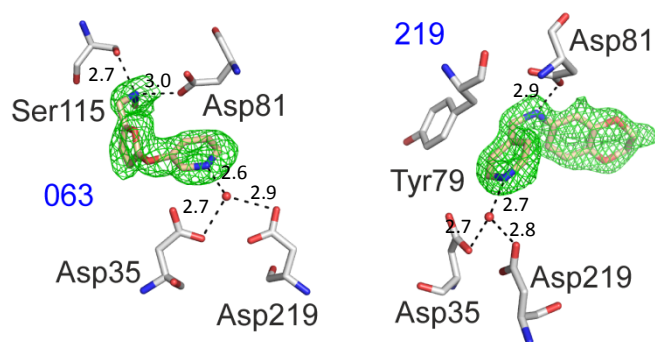


Abbildung 3.58: die beiden Komplexstrukturen in denen das Fragment über ein Wasser vermittelt an die katalytischen Aspartate bindet. In grün ist die Fo-Fc Dichte bei  $2\sigma$  gezeigt.

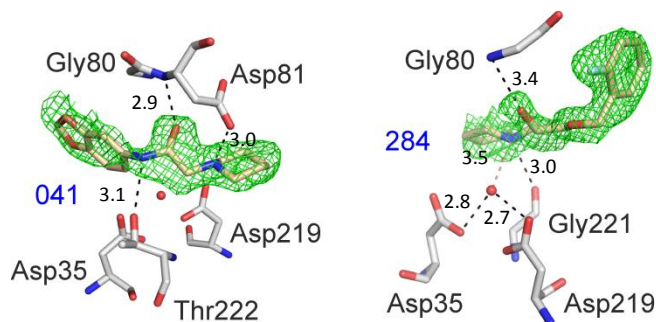


Abbildung 3.59: die beiden Komplexstrukturen in denen die Fragmente keine oder nur eine sehr schwache Interaktion zu der katalytischen Diade ausbilden. In grün ist die  $F_o - F_c$  Dichte bei  $2\sigma$  gezeigt.

Eine über Wasser vermittelte Bindung wurde für die Fragmente 63 und 291 beobachtet (Abbildung 3.58). In beiden Fällen vermittelt das katalytische Wasser eine Interaktion zwischen einem Pyridin-ähnlichen Stickstoff und der katalytischen Diade. Neben der Interaktion zu den katalytischen Aspartaten bildet 63 mit seiner sekundären Aminogruppe am anderen Ende des Fragments zwei Wasserstoffbrücken, eine zu dem *Flap*-Aspartat (Asp81) und eine zu Ser115, aus. Der zentrale Teil des Fragments adressiert die S1-Tasche. 291 bildet mit seinem sekundären Stickstoff ebenfalls eine Interaktion zu Asp81. Zusätzlich bildet der Pyridinring eine  $\pi$ - $\pi$ -Wechselwirkung zu Tyr79 und die Benzdioxangruppe zeigt in Richtung der S3-Tasche.

41 und 284 zeigen keine oder bestenfalls lediglich eine sehr schwache Interaktion mit den beiden katalytischen Aspartaten (Abbildung 3.59). 41 bildet zwei Wasserstoffbrücken zu der *Flap*-Region. Eine über den Pyridinstickstoff zu der Carboxylatgruppe von Asp81 und eine über seine Carbonylgruppe zu dem Rückgrat NH derselben Aminosäure. Zudem bildet der Amidstoff von 41 eine Wasserstoffbrücke zu Thr222 im Bereich der S2-Tasche. Das aromatische Piperonyl-Ringsystem zeigt in Richtung der S1'-Tasche während der hydrophobe Anteil des Piperidinerings die S1-Tasche besetzt.

284 bildet mit seiner Hydroxygruppe eine Wasserstoffbrücke zum Rückgratstickstoff von Gly80 der *Flap*-Region. Der durch die sauren experimentellen Bedingungen höchstwahrscheinlich geladene Pyrrolidin-Stickstoff geht eine Wechselwirkung zu Gly221 am Boden der Bindetasche ein ( $3.0 \text{ \AA}$ ). Zudem wird eine zweite eher lange Wasserstoffbrücke ( $3.5 \text{ \AA}$ ) zu dem katalytischen Wasser zwischen den beiden Aspartaten ausgebildet. Der hydrophobe Anteil des Pyrrolidinrings besetzt die S1-Tasche, während der gegenüberliegende aromatische Ring der S2-Tasche zugewendet ist.

Die Differenz-Elektronendichtekarten von 41 und 284 sind im Vergleich zu den anderen neun Fragmenten weniger gut definiert, was auf eine gewisse Flexibilität dieser Fragmente innerhalb der Bindetasche hinweist. Dies kann sich dadurch erklären, dass

sich die Fragmente nicht in direktem Kontakt zu der fixierten, höchst wahrscheinlich geladenen katalytischen Diade befinden.

Die Proteinkonformation bleibt über alle elf Kristallstrukturen praktisch unverändert. Insbesondere die sehr flexible *Flap*-Region befindet sich in allen Fällen in der geschlossenen Konformation und variiert nur minimal zwischen den einzelnen Strukturen. Da die meisten Fragmente unter dieser geschlossenen *Flap* binden ist die vergrabene Oberfläche verhältnismäßig groß. Sie variiert zwischen 65 % (216) und 83 % (041, 109 und 005). Ähnlich weisen die Verbindungen eine vergrabene hydrophobe Oberfläche zwischen 67 % (216) und 93 % (63) auf. Diese Werte wurden mit dem Programm MS mit einem Sondenradius von 1.4 Å berechnet.<sup>[132]</sup> Eine detaillierte Auflistung der vergrabenen Oberfläche der einzelnen Fragmente findet sich in Tabelle 3.20.

Fragment	Gesamte Oberfläche [Å <sup>2</sup> ]	hydrophobe Oberfläche [Å <sup>2</sup> ]	Gesamte vergrabene Oberfläche	Hydrophobe vergrabene Oberfläche
005	152.8	107.7	83 %	87 %
041	263.7	193.9	83 %	89 %
063	216.3	151.0	82 %	93 %
109	234.0	163.9	83 %	91 %
148	258.9	200.3	80 %	85 %
216	203.5	144.9	68 %	67 %
255	261.2	201.2	82 %	89 %
284	264.6	223.8	77 %	80 %
290	195.4	141.2	77 %	77 %
291	245.9	180.7	75 %	88 %
306	200.5	145.5	75 %	75 %

Tabelle 3.20: Vergrabene Oberfläche der einzelnen Fragmente berechnet mit dem Programm MS (bei einem Vergleich mit der anfangs mittels MOE berechneten polaren Oberfläche (TPSA) ist zu beachten, dass die MOE-Berechnung lediglich tabellarische Werte für jedes beteiligte Atom aufaddiert während die MS-Berechnung die dreidimensionale Natur der Moleküle berücksichtigt).

Eine Überlagerung aller Kristallstrukturen ist in Abbildung 3.60 gezeigt. Annähernd der gesamte Raum der Bindetasche wird durch die verschiedenen Fragmente besetzt. Neben der Bindung an die katalytische Diade können mehrere bevorzugte Interaktionen beobachtet werden. Die folgenden Interaktionen heben einige dieser Interaktionen hervor. Sieben Verbindungen (005, 041, 148, 255, 284, 291 und 109) orientieren einen hydrophoben Teil in Richtung der S1-Tasche. Eine Carbonylgruppe

des Liganden adressiert den Rückgratstickstoff des *Flap*-Aspartats in drei Fällen (041, 148 und 148). Die Hydroxygruppe des Thr222 am Boden der Bindetasche wird mit einer NH Funktionalität von 005 und 148 angesprochen. Bemerkenswerterweise können alle diese Interaktionen auch bei Pepstatin, einem gut bekanntem hoch potenten Inhibitor für die meisten Aspartylproteasen, beobachtet werden (Abb. 3.61). Der Vergleich mit Pepstatin ist besonders interessant, da dieser Inhibitor nicht synthetisch erhalten, sondern von Mikroorganismen nach den Prinzipien der Evolution optimiert wurde.

Obwohl die meisten Interaktionen der Fragmente mit dem Protein auch von bekannten Inhibitoren wie Pepstatin ausgebildet werden, zeigen die hier vorgestellten Kristallstrukturen sieben neue Interaktionsmuster mit der katalytischen Diade, die bisher noch für keine pepsin-ähnliche Aspartylprotease beschrieben wurden.

Eine genauere Untersuchung der Bindungsposen zeigt verschiedene Möglichkeiten auf, in der Bindetasche gebundenes Wasser zu ersetzen. Um einen Eindruck von der Wasserstruktur in Endothiapepsin zu erhalten, wurden alle im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Strukturen überlagert und die Wasser in der Bindetasche genauer betrachtet. Wassermoleküle, die in den verschiedenen Strukturen an derselben Position beobachtet werden und einen vergleichsweise niedrigen B-Wert aufweisen, wurden als geordnete Wasser klassifiziert. Wassermoleküle, welche in den verschiedenen Strukturen in einer Region, allerdings nicht an exakt derselben Stelle, auftreten und einen vergleichweisen hohen B-Wert aufweisen, wurden als ungeordnete Wasser angesehen. Die Position dieser Wasser wurde mit der Position der Fragmente verglichen. Während in vier unserer Strukturen das katalytische Wasser von einem höchstwahrscheinlich geladenem Stickstoff verdrängt wird, werden die ungeordneten Wasser der S2- und S1'-Tasche durch hydrophobe Gruppen substituiert. Ein Wasser, das sich zwischen Asp81, Ser83 und Ser115 befindet, wird nicht direkt ersetzt sondern durch ein naheliegendes sekundäres Stickstoffatom (063 oder 284) oder einen hydrophoben Rest (109) verdrängt. In allen Strukturen, in denen die katalytische Diade durch eine Amidgruppe angesprochen wird, wird ein Wassermolekül, das an Gly37 gebunden ist durch den Amidin-Stickstoff, der an den äußeren Sauerstoff von Asp35 gebunden hat, verdrängt.

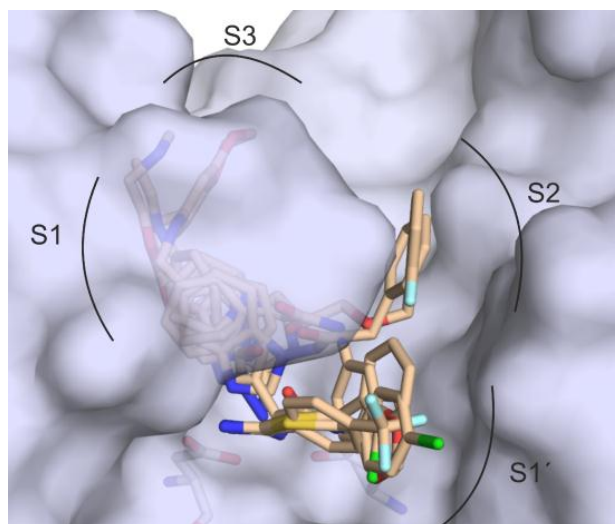


Abbildung 3.60: Überlagerung aller 11 Komplexstrukturen

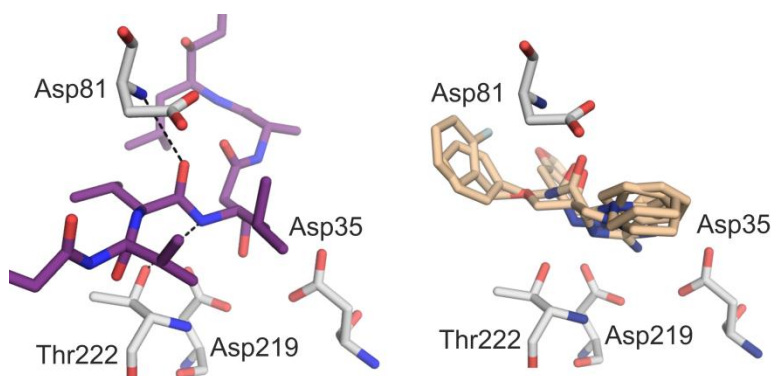


Abbildung 3.61: Links: Bindemodus von Pepstatin in Endothiapepsin(Kohlenstoffatome in lila) wobei zwei ausgewählte Interaktionen mit gestrichelten Linien angedeutet sind. Dem Bild liegt die Komplexstruktur von Pearl et al. zugrunde (PDB- Code: 4ER2).<sup>[79]</sup> Rechts: Überlagerung von vier Fragmenten in der Bindetasche von Endothiapepsin.

### Kristallographische Tabellen

Fragment	<b>109</b>	<b>005</b>	<b>148</b>	<b>255</b>	<b>216</b>	<b>290</b>
PDB Code	3PBZ	3PBD	3PMY	3PM4	3PCW	3PLD
<b>Datensammlung und Prozessierung</b>						
Sammlungsort	BL 14.2	In-house	BL 14.2	In-house	BL 14.2	BL 14.3
$\lambda$ [Å]	0.91841	1.54178	0.91841	1.54178	0.91841	0.89440
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>
Einheitszellkonstanten						
a [Å]	45.1	45.3	45.4	45.2	45.3	45.3
b [Å]	73.3	73.1	73.1	73.5	73.1	73.0
c [Å]	52.4	52.7	52.8	52.5	52.5	52.8
$\beta$ [°]	109.2	109.8	109.6	109.2	109.5	109.6
Resolution [Å]	30 - 1.48	30 - 1.70	30 - 1.38	40 - 1.68	20 - 1.25	40 - 1.40

Höchste Auflösungsschale	1.51-1.48	1.73–1.70	1.40-1.38	1.71-1.68	1.27-1.25	1.42-1.40
Anzahl einzelner Reflexe	51357	35536	65186	37129	86999	63118
R <sub>sym</sub> [%] <sup>a</sup>	5.8 (25.5)	4.6 (20.8)	4.6 (21.9)	4.1 (21.2)	3.6 (18.9)	5.9 (33.0)
Vollständigkeit [%] <sup>a</sup>	95.5(86.0)	99.5(99.3)	97.7(87.5)	100(100)	98.0(84.5)	99.3(97.6)
Redundanz	2.7 ( 2.0)	2.8 (2.6)	3.0 (2.0)	3.9 (3.6)	3.6 (2.1)	3.1 (2.6)
I/σ <sup>a</sup>	15.9 (2.7)	29.4 (4.7)	22.1 (3.8)	31.4 (6.0)	27.9 (3.9)	18.5 (2.4)

**Verfeinerung**

Verwendetes Programm	SHELXL	SHELXL	SHELXL	SHELXL	SHELXL	SHELXL
Anisotrop verfeinert	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Ja
Letzter R <sub>free</sub> <sup>b</sup>	17.9	19.6	16.2	19.3	15.0	16.6
Letzter R <sub>work</sub> <sup>b</sup>	12.8	15.3	12.2	15.3	11.6	12.9
Anzahl Wassermoleküle	260	323	292	303	304	300
Ramachandran Diagramm						
Bevorzugte Regionen(%)	94.2	92.8	94.6	93.9	93.5	94.6
Erlaubte Regionen(%)	5.8	7.2	5.4	6.1	6.5	5.4
Durchschnittliche B-Werte (Å <sup>2</sup> )						
Protein Atome	14.2	16.3	11.4	16.5	12.0	13.0
Wasser	27.7	28.7	25.4	28.4	26.3	26.7
Inhibitor (fragment)	28.3	28.6	31.0	20.5	21.5	23.7
Andere Liganden <sup>c</sup>	27.6	24.4	17.5	25.0	24.3	19.9
RMSD Bindungslängen [Å]	0.009	0.007	0.011	0.008	0.013	0.010
RMSD Bindungswinkel [°]	2.7	2.4	2.7	2.5	2.8	2.7

<sup>a</sup> Wert in Klammern bezieht sich auf die höchste Auflösungsschale<sup>b</sup> die angegebenen R-Werte beziehen sich jeweils auf die gesamten Daten<sup>c</sup> andere Liganden sind Glycerol und/oder DMSO

Tabelle 3.21: Kristallographische Tabelle Teil 1

Fragment	<b>306</b>	<b>63</b>	<b>291</b>	<b>41</b>	<b>284</b>
PDB Code	3PLL	3PB5	3PIO	3PGI	3PMU
<b>Datensammlung und Prozessierung</b>					
Sammlungsort	BL 14.3	In-house	BL 14.3	In-house	BL 14.2
λ [Å]	0.89440	1.54178	0.89440	1.54178	0.91841
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub>
Einheitszellkonstanten					
a [Å]	45.2	45.3	45.3	45.3	45.2
b [Å]	73.1	73.0	73.0	72.8	73.7
c [Å]	52.7	52.5	52.7	52.8	52.5
β [°]	109.6	109.5	109.4	109.6	109.3
Auflösung [Å]	40 – 1.73	30 – 1.90	40 – 1.64	30 – 1.90	20 – 1.43
Höchste Auflösungsschale	1.76-1.73	1.93-1.90	1.67-1.64	1.93-1.90	1.45-1.43
Anzahl einzelner Reflexe	32328	25453	38684	25348	59547
R <sub>sym</sub> [%] <sup>a</sup>	7.2 (34.7)	7.2 (30.0)	5.3 (33.3)	6.5 (28.7)	7.3 (42.9)
Vollständigkeit [%] <sup>a</sup>	96.4(94.7)	100(99.6)	98.0(97.2)	99.2(96.0)	99.4(98.2)
Redundanz <sup>a</sup>	3.1 (2.8)	4.0 (3.6)	3.0 (2.6)	3.6 (3.2)	3.1 (2.7)
I/σ <sup>a</sup>	13.2 (2.6)	19.0 (4.1)	20.4 (3.0)	26.7 (4.3)	14.3 (2.3)
<b>Verfeinerung</b>					
Verwendetes Programm	SHELXL	SHELXL	SHELXL	SHELXL	PHENIX

Anisotrop verfeinert	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Letzter $R_{\text{free}}^b$	22.0	22.2	18.4	21.5	18.9
Letzter $R_{\text{work}}^b$	16.3	16.1	15.1	16.2	16.5
Anzahl Wassermoleküle	236	237	254	239	264
Ramachandran Diagramm					
Bevorzugte Regionen(%)	93.1	92.8	94.2	93.1	93.9
Erlaubte Regionen(%)	6.9	7.2	5.8	6.9	6.1
Durchschnittliche B-Werte ( $\text{\AA}^2$ )					
Proteinatome	14.8	17.1	13.0	21.4	13.7
Wasser	24.9	27.5	25.4	30.6	24.5
Inhibitor (Fragment)	18.2	30.8	25.5	46.0	32.9
Andere Liganden <sup>c</sup>	22.3	32.2	24.8	40.4	-
RMSD Bindungslängen [ $\text{\AA}$ ]	0.007	0.006	0.008	0.006	0.005*
RMSD Bindungswinkel [ $^\circ$ ]	2.4	2.2	2.5	2.2	1.1*

<sup>a</sup> Wert in Klammern bezieht sich auf die höchste Auflösungsschale

<sup>b</sup> die angegebenen R-Werte beziehen sich jeweils auf die gesamten Daten

<sup>c</sup> andere Liganden sind Glycerol und/oder DMSO

Tabelle 3.22: Kristallographische Tabelle Teil 2

### 3.6.5 Diskussion

Die mit Hilfe eines Fluoreszenz-basierten Assays erhaltenen Ergebnisse sowie die Komplexstrukturen mit Endothiapepsin legen nahe, dass die entwickelte Bibliothek für ein kristallographisches Fragmentenscreening gut geeignet ist, insbesondere, da sie nicht speziell für Aspartylproteasen, sondern für alle möglichen Zielproteine zusammengestellt wurde. Trotzdem ist diese Vermutung als vorläufig anzusehen, da sie lediglich auf den Ergebnissen mit einem einzigen Zielprotein beruht. Für dieses Protein konnten elf Kristallstrukturen aus einer 364-gliedrigen Bibliothek erhalten werden. In diesem Zusammenhang ist es auch erwähnenswert, dass einer unserer Industriepartner auf diesem Projekt die Bibliothek gegen die Phosphodiesterase PDE4 sowie die Kinase CHK1 getestet und dort acht Hits (PDE4) bzw. vier Hits (CHK1) erhalten hat (D. Ullmann, T. Neufeind, Proteros GmbH Munich, Germany, persönliche Kommunikation).

Die Löslichkeit der Fragmente in der zusammengestellten Bibliothek ist sehr vielversprechend und unterstreicht die Wichtigkeit dieser Eigenschaft. 66 % der Verbindungen zeigen eine Löslichkeit von wenigstens 1.5 mmol/L und 76 % sind wenigstens bei 1 mmol/L löslich. Die Löslichkeit ist eine für den Erfolg kritische Eigenschaft, da Fragmente als schwache Binder in verhältnismäßig hohen Konzentrationen in der Kristallisation wie auch im Assay eingesetzt werden müssen.

Wie schon angedeutet wurde, ist die Zusammenstellung unserer Bibliothek nicht konform zu der Dreierregel von Astex. In Bezug auf das Molekulargewicht, logP sowie die TPSA stimmen wir mit dieser Regel überein. Bezogen auf die freidrehbaren



Bindungen, die Anzahl der Wasserstoffbrücken-Donoren und besonders der Wasserstoffbrücken-Akzeptoren decken unsere Fragmente aber entgegen der Regel einen erweiterten Bereich ab. Hätten wir unsere Bibliothek streng nach den Beschränkungen der Dreierregel zusammengestellt hätten wir sieben der elf kristallographisch erfolgreichen Fragmente nicht entdecken können. Bemerkenswert ist auch die Tatsache, dass alle vier verbleibenden, mit der Dreierregel übereinstimmenden Fragmente eine Amidin-ähnliche Gruppe aufweisen. Mit Blick auf ein darauf aufbauendes Wirkstoffdesign mit anschließenden chemischen Modifikationen bieten diese Verbindungen lediglich einen engen Raum möglicher Grundgerüste. Von einem Forschungsprojekt basierend auf einer fragmentbasierten Leitstruktursuche wird ein weit größerer Bereich an chemischer Diversität erwartet. Deshalb ist eine Beschränkung auf weniger als drei Donoren, Akzeptoren sowie freidrehbare Bindungen fragwürdig.

In Bezug auf das Erweitern sowie Verknüpfen verschiedener Fragmente ist eine ausreichende Anzahl an synthetisch zugänglichen funktionalen Gruppen außerordentlich wichtig für die chemische Synthese. Normalerweise sind funktionelle Gruppen Motive, die Wasserstoffbrücken Akzeptor oder Donor Eigenschaften aufweisen. Ein Aufweiten entsprechender Kriterien wird den verfügbaren Fragmentschatz erweitern und führt möglicherweise zu höheren Hitraten an bindenden Fragmenten, die dann für ein Wirkstoffdesign zur Verfügung stehen.

### 3.6.6 Schlussfolgerung

Der Erfolg einer Fragmentbibliothek in der Kristallisation sowie der anschließenden Optimierung der Fragmente, wird nicht nur von der Zusammenstellung der darin enthaltenen Verbindungen bestimmt. Die korrekte Auswahl experimenteller Screening Bedingungen ist gleichermaßen entscheidend, um sinnvolle Treffer zu entdecken. In unserem Fall haben wir einen funktionellen Assay mit 1 mmol/L Ligandkonzentration verwendet und eine wenigstens 40 %ige Inhibition des Proteins verlangt. Auf der einen Seite war dieses Kriterium recht erfolgreich, da wir aus den resultierenden 55 Assay-Hits elf Komplexstrukturen erhalten haben. Auf der anderen Seite ist es bemerkenswert, dass keine offensichtliche Korrelation zwischen der beobachteten Inhibitionsstärke und der Wahrscheinlichkeit eine Komplexstruktur zu erhalten, aufgestellt werden kann. Es ist sogar möglich, dass noch weitere Verbindungen mit einer noch geringeren Inhibitionsrate ebenfalls in der Lage sind, in den Proteinkristall einzudiffundieren und ihre erfolgreiche Bindung durch eine Kristallstruktur zu belegen. Ein *Ranking* der Fragmente anhand der Assayergebnisse scheint nur Hinweiskarakter zu besitzen aber in keiner Weise ein verlässliches Kriterium zu sein. In der Literatur gibt es eine Vielzahl an Protokollen mit alternativen Screening Techniken, wie z.B. SPR,

NMR, funktionelle biochemische Assays, Massenspektrometrie oder Verdrängungstitrationen. Interessanterweise weisen die resultierenden Trefferlisten manchmal lediglich eine minimale Überlappung auf. Die physikalischen Grundlagen für diese Beobachtungen sind noch immer unklar. Nichtsdestotrotz benötigt ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign mit einer fragmentbasierten Leitstruktursuche gut aufgelöste Strukturen als einen Startpunkt für das medizinisch-chemische Folgeprogramm. Normalerweise ist dies eine Kristallstruktur. Die letzte Konsequenz dieser Beobachtung kann sein, dass ein Fragmentscreening primär mit Proteinkristallen durchgeführt werden muss. Dass ein solches, rein kristallographisches Screening prinzipiell möglich und vielversprechend ist, wurde bereits von Astex demonstriert.<sup>[81]</sup> Routinemäßig und im größeren Maßstab ist eine solche Strategie momentan allerdings kaum durchführbar. Um alle Fragmente einer Bibliothek kristallographisch zu testen, benötigen die meisten Setups eine weitergehende Automatisierung sowie einen regelmäßigeren Zugang zu Synchrotron-Strahlzeit. Um ein solches Konzept zu verwirklichen, wäre ein Ausbau der Röntgenanlagen erforderlich.

Nichtsdestoweniger konnten in diesem Projekt elf Kristallstrukturen mit einem Fragment, gebunden an Endothiapepsin, erhalten werden. Diese Fragmente füllen nahezu den gesamten Raum der verschiedenen Spezifitätstaschen und zeigen unterschiedliche Bindungsmoden. Dabei lassen sie sich in drei Kategorien unterteilen: Direkte Bindung an die katalytischen Aspartate, eine Bindung vermittelt über ein Wassermolekül sowie keine direkte Bindung an die katalytische Diade. Neben neuen Ideen das aktive Zentrum von Aspartylproteasen zu adressieren, sind die Fragmentstrukturen ebenfalls geeignet um experimentell bevorzugte Bindestellen zu erkunden. Eine Überlagerung aller Strukturen ermöglicht es, mögliche Interaktionsmuster und Bindungsmotive innerhalb der Protease abzubilden. Bemerkenswerterweise nutzt Pepstatin, ein potenter, nichtselektiver Aspartylproteaseinhibitor, bevorzugte Interaktionen, die durch unsere Fragmente aufgezeigt wurden, um eine potente Bindung zu erreichen.

## 4 Proteinkinase A – Einleitung

### 4.1 Die Bedeutung der Proteinkinase A

Kinasen sind regulatorische Enzyme, die an fast allen Stoffwechselwegen beteiligt sind. Sie übertragen die terminale Phosphatgruppe von ATP (Adenosintriphosphat) auf spezifische Serin-, Threonin- oder Tyrosin- Reste anderer Enzyme und regulieren damit deren Aktivität. Kinasen lassen sich abhängig von ihrem strukturellen Aufbau in verschiedene Gruppen einsortieren. Die Proteinkinase A (synonym: cAMP abhängige Proteinkinase) gehört dabei in die Gruppe der AGC Kinasen. Die Bezeichnung leitet sich von ihren drei Hauptvertretern, Proteinkinase A, Proteinkinase G und Proteinkinase C, ab. Diese Gruppe umfasst eine Reihe der wichtigsten intrazellulären Kinasen welche über sekundäre Botenstoffe wie zyklische Nukleotide, Phospholipide oder Kalzium gesteuert für eine Signalweiterleitung sorgen. Mit 63 der insgesamt 518 bekannten humanen Kinasen ist diese Gruppe eine der größten.<sup>[133]</sup>

Die Proteinkinase A (im folgenden PKA abgekürzt) ist die mit Abstand am besten untersuchte Kinase. Sie war eine der ersten Kinasen, die entdeckt wurde, sowie die erste, die sequenziert und rekombinant hergestellt wurde. Die Kristallstruktur der katalytischen Untereinheit war die erste Struktur einer Kinase und diente damit als Modellsystem für die gesamte Familie.<sup>[134]</sup>

Im menschlichen Körper ist die PKA in vielfältigen Stoffwechselwegen involviert. Sie wird durch den sekundären Botenstoff cAMP aktiviert und leitet auf diesem Weg Signale weiter die der Regulierung vieler zum Teil grundlegender Prozesse im Zellzyklus, dem Stoffwechsel und der Genregulation dienen. So ist sie, um lediglich einige wenige Beispiele zu nennen, z.B. an der Regulierung der Glykolyse, des Blutdrucks sowie des Triglycerid-Haushalts beteiligt.<sup>[135-137]</sup> Eine Spezifität wird dabei, neben den verschiedenen Isoformen der regulatorischen Untereinheit, in erster Linie durch die räumliche Fixierung an unterschiedliche AKAPs (A-kinase-anchoring-proteins, engl. A-Kinase-Anker-Proteine) erreicht.<sup>[138]</sup>

Lange Zeit galten Kinasen als unattraktiv für ein Wirkstoffdesign. Da in allen Fällen ATP das Substrat ist, schien es kaum möglich, selektive Inhibitoren zu entwickeln. Kristallstrukturen verschiedener Kinase-ATP-Komplexe zeigten allerdings, dass die Bindetaschen oft noch von ATP nicht besetzten Platz aufweisen, der stark innerhalb der Familie variiert. Somit bieten diese Bereiche die Möglichkeit selektive ATP-kompetitive Inhibitoren zu entwickeln. Das Kinasen vielversprechende Zielproteine darstellen, beweist nicht zuletzt die Erfolgsgeschichte der Entwicklung von Imatinib, einem Inhibitor der Tyrosinkinase ABL, der zur Behandlung der chronischen

myeloischen Leukämie zugelassen ist.<sup>[139]</sup> Mittlerweile gelten Kinasen als die im industriellen Umfeld meist beforschte Enzymklasse.

## 4.2 Struktur

Die PKA setzt sich aus zwei katalytischen (je 41 kDa) sowie zwei regulatorischen Untereinheiten (je 46 kDa) zusammen. In Säugetieren sind von der katalytischen Untereinheit drei Isoformen (alpha, beta und gamma), von der regulatorischen vier Isoformen bekannt (Typ I alpha, Typ II alpha, Typ I beta und Typ II beta), wobei von einigen Untereinheiten noch zusätzliche Splicevarianten existieren. Im inaktiven Zustand binden die beiden katalytischen Untereinheiten an ein Dimer der regulatorischen Untereinheit, das in der Regel wiederum an die A-Protein Ankerproteine gebunden ist. Jede der regulatorischen Untereinheiten besitzt zwei cAMP Bindebereiche. Die Bindung von cAMP führt zu einer Konformationsänderung, worauf die katalytischen Untereinheiten freigesetzt werden (Abb. 4.1). Die freie katalytische Untereinheit kann nun nach der Bindung von ATP ihre Zielproteine phosphorylieren.<sup>[134]</sup>

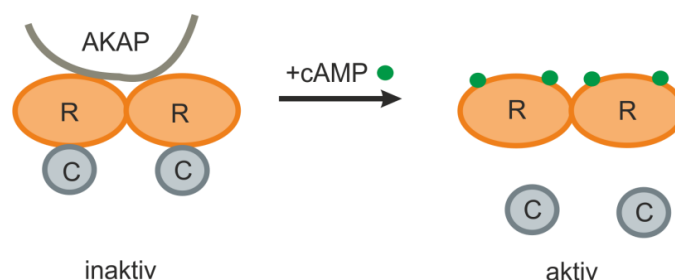


Abbildung 4.1: Aktivierung der PKA über cAMP. Die regulatorische Untereinheit ist mit R bezeichnet, die katalytische mit C. AKAP bezeichnet ein A-Protein-Ankerprotein.

Die katalytischen Untereinheiten besitzen je eine ATP-Bindestelle sowie eine Substratbindestelle. Die regulatorischen Untereinheiten sind aus einer Dimerisierungsregion am N-Terminus, gefolgt von einer Inhibitorsequenz sowie zwei cAMP-Bindungsdomänen aufgebaut. Mit der Inhibitorsequenz bindet die regulatorische an die Substratbindestelle der katalytischen Untereinheit. Abbildung 4.2 zeigt links die Kristallstruktur der katalytischen Untereinheit alpha im Komplex mit der regulatorischen Untereinheit alpha I. Der regulatorischen Untereinheit fehlt dabei die Dimerisierungsregion, weshalb sich lediglich ein Heterodimer ausbildet. Rechts ist die NMR-Struktur der Dimerisierungseinheit der regulatorischen Untereinheit mit einer kurzen Sequenz eines Ankerproteins (AKAP) gezeigt<sup>[140, 141]</sup> (Ein Model des gesamten Komplexes findet sich in dem Review von Taylor et al.<sup>[142]</sup>).

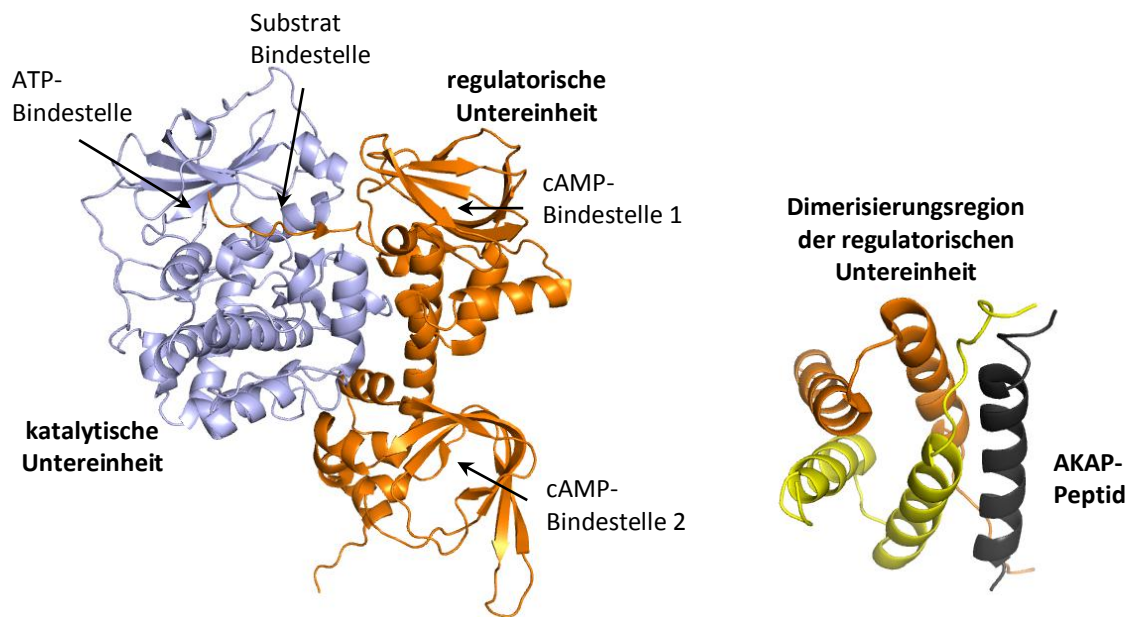


Abbildung 4.2: Links: Komplex der katalytischen Untereinheit alpha (blau) mit einer, am N-Terminus verkürzten, regulatorischen Untereinheit alpha I (rot), basierend auf PDB-Code: 2QCS.<sup>[140, 141]</sup> Rechts: Die Dimerisierungsregion (als Dimer, orange und gelb) der regulatorischen Untereinheit im Komplex mit einem AKAP-Peptid (grau), basierend auf PDB-Code: 2DRN.

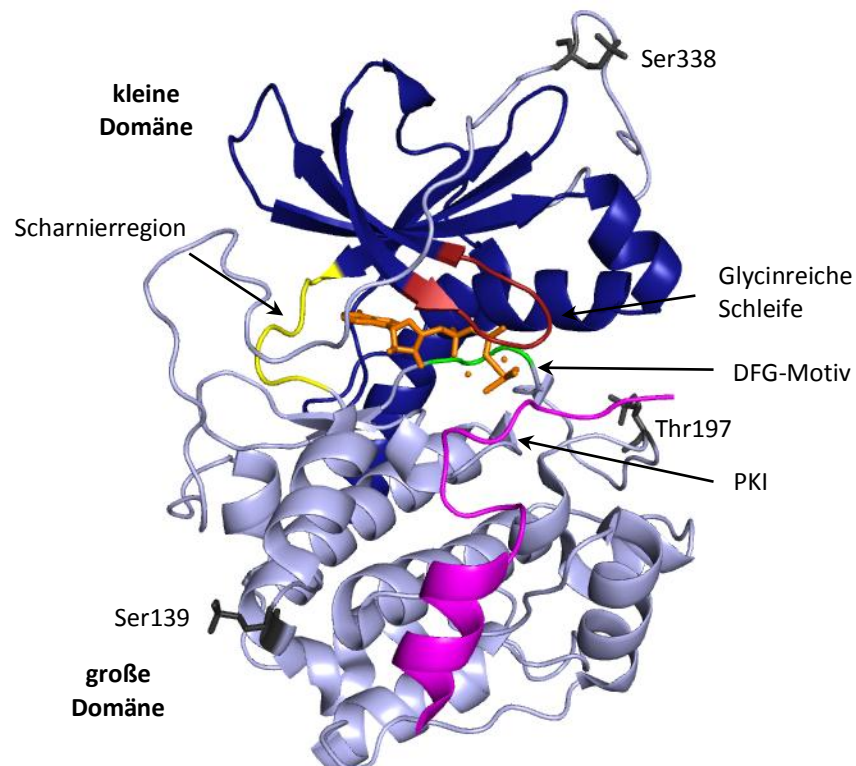


Abbildung 4.3: Die katalytische Untereinheit alpha der cAMP abhängigen Kinase der Maus im Komplex mit einem Übergangszustand-Analoga und Magnesium (beide orange) und PKI (pink), basierend auf PDB-Code 1L3R.<sup>[143]</sup> Die kleine Domäne ist dunkelblau eingefärbt, die große hellblau. Die Scharnierregion ist gelb dargestellt, die glycinreiche Schleife rot und das DFG-Motiv in grün. Zudem sind die phosphorylierten Aminosäuren grau hervorgehoben.

Da in dieser Arbeit die katalytische Untereinheit verwendet wird, ist diese in Abbildung 4.3 nochmals im Detail dargestellt. Sie ist aus einer großen und einer kleinen Domäne aufgebaut, welche durch die so genannte Scharnierregion verbunden sind. Am N-terminalen Ende weist das Protein einen Myristinsäure-Rest auf (nicht im Bild, da im Kristall die ersten ca. 13 Aminosäuren normalerweise ungeordnet vorliegen). Des Weiteren finden sich im aktiven Protein bis zu drei phosphorylierte Aminosäuren: Ser139, Thr197 sowie Ser338. Thr197 ist Teil der so genannten Aktivierungsschleife. Während die Phosphorylierung an dieser Stelle in Bakterien autokatalytisch stattfindet, erfolgt sie bei Säugetieren durch PDK1 oder eine PDK1-ähnliche Kinase (Phosphoinositid-abhängige Kinase-1, eine so genannte Master Kinase). Die Phosphorylierung bewirkt eine Konformationsänderung und damit Aktivierung des Enzyms.<sup>[144]</sup>

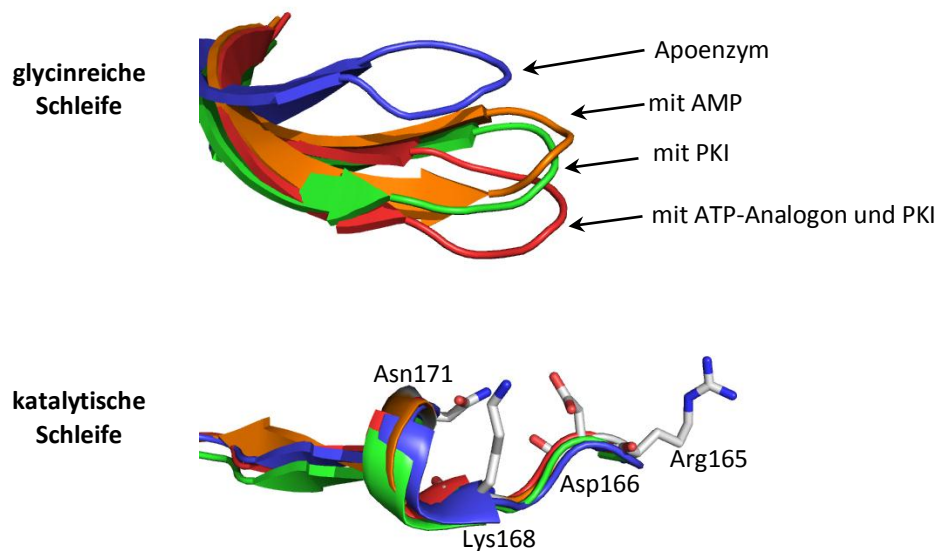


Abbildung 4.4: Position der glycinreichen Schleife relativ zur katalytischen Schleife in verschiedenen Komplexstrukturen. In blau ist das Apoenzym gezeigt (PDB-Code: 1J3H)<sup>[145]</sup>, in orange der Komplex mit Adenosinmonophosphat (1BKX)<sup>[146]</sup>, in grün der Komplex mit PKI (1JLU)<sup>[147]</sup>, in rot der Komplex mit einem ATP-Analogon und PKI (1L3R)<sup>[143]</sup>. Zur besseren Orientierung sind zusätzlich einige Aminosäuren der katalytischen Schleife dargestellt. Die Abbildung orientiert sich an einer ähnlichen Abbildung von Taylor et al.<sup>[148]</sup>

Die ATP Bindestelle befindet sich zwischen den beiden Domänen. Bindet ATP, bewegen sich die Domänen zueinander, wodurch die glycinreiche Schleife die ATP-Bindestelle halb verschließt. Nach der Bindung des Substrats schließt sich diese Schleife noch weiter und ermöglicht so die Katalyse. Hat kein ATP Molekül gebunden, führt die Bindung eines Peptids an die Substratbindestelle ebenfalls zu einem teilweisen Schließen der glycinreichen Schleife (Abbildung 4.4).<sup>[148]</sup>

In Kristallisationsexperimenten wird die Substratbindestelle meist durch ein PKI-Bruchstück (Proteinkinase Inhibitor) besetzt und damit das Protein in einer

halbgeschlossenen Position fixiert. PKI ist ein natürlich vorkommendes PKA-inhibierendes Protein, das die typische Substratsequenz Arg-Arg-Gly-Ser/Thr-Ile besitzt, wobei das Serin bzw. Threonin durch ein Alanin ersetzt sind. Dadurch kann PKI zwar effektiv an PKA binden, nicht aber als Phosphatgruppen-Akzeptor fungieren.

Zusätzlich zu den hier dargestellten Strukturelementen sind auch weitere Bereiche mit regulatorischen Funktionen bekannt. So gibt es z.B. am N-Terminus noch eine Bindestelle für A-Kinase-Interaktionsproteine (AKIP) sowie am C-Terminus ein Erkennungsmotiv für PDK1<sup>[134]</sup>. Erwähnenswert ist auch noch das APE-Motiv, ein hochkonservierter Bereich in der Nähe der Aktivierungsschleife (Aminosäuren 206-208).<sup>[144]</sup>

### 4.3 Bindung von ATP und Mechanismus

Abbildung 4.5 zeigt die Bindung von ATP in der Bindetasche anhand der Kristallstruktur der PKA im Komplex mit ATP und PKI.<sup>[149]</sup> ATP bindet zusammen mit zwei Magnesium-Ionen, welche die Phosphatgruppen des ATP-Moleküls koordinieren und deren negative Ladung ausgleichen. Die vergleichsweise niedrige Affinität von ATP alleine ( $K_d = 120 \mu\text{M}$ ) wird durch die Anwesenheit von Magnesium signifikant gesteigert ( $K_m = 4.2 \mu\text{M}$ ).<sup>[150]</sup>

ATP, Adenosintriphosphat, setzt sich aus einem Adeninrest, dem Ribosezucker sowie drei Phosphatgruppen zusammen. Der Adeninrest bindet über zwei Wasserstoffbrücken an die Scharnierregion sowie an Thr183. Der Ribosebaustein interagiert neben den beiden Glutamaten 127 und 170 auch mit dem Arginin-Rest des Substrats. Die Phosphatreste werden durch Lys72, Asn171, Asp184, Lys168 direkt oder über die dort gebundenen Magnesiumionen koordiniert. Asp184 ist Teil des DFG-Motivs, einer in allen Kinasen hochkonservierten Struktur. Ser53 an der Spitze der glycinreichen Schleife bindet sowohl an die Akzeptoraminosäure des Substrats als auch das  $\gamma$ -Phosphat des ATP (PKI besitzt an dieser Stelle lediglich ein Alanin anstelle eines Serin oder Threonin-Rests). Asp166 bindet an die Hydroxygruppe der Akzeptoraminosäure und übernimmt die Rolle der katalytischen Base. Auf diese Weise kann der Hydroxysauerstoff der Akzeptoraminosäure das  $\gamma$ -Phosphat direkt nucleophil angreifen.<sup>[151]</sup> Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Katalyse ist die Freisetzung von ADP, die wesentlich von der  $\text{Mg}^{2+}$ -Konzentration der Umgebung abhängt.<sup>[152]</sup>

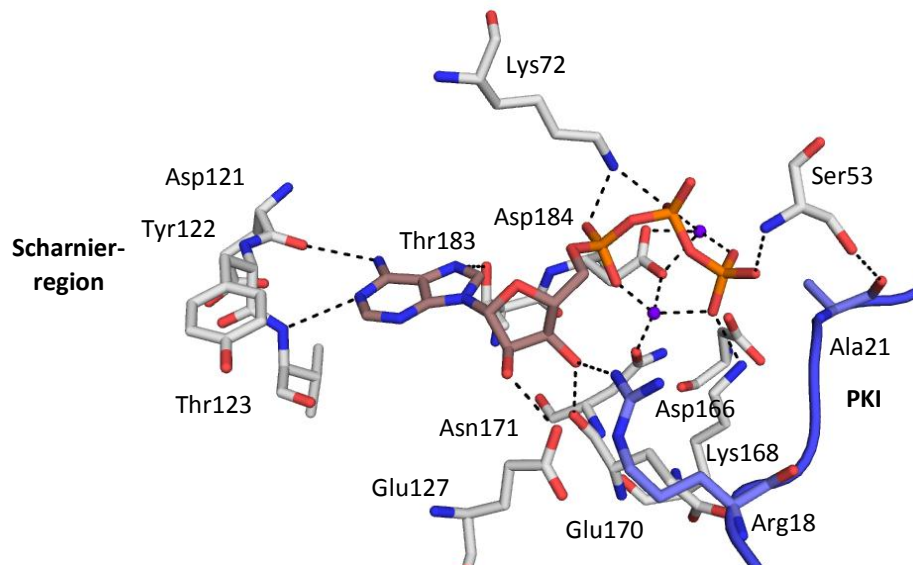


Abbildung 4.5: PKA im Komplex mit Mn-ATP und PKI (PDB-Code: 1ATP). Die Kohlenstoffatome der katalytischen Untereinheit sind weiß eingefärbt, die von ATP braun und die von PKI blau. Die beiden Mangan-Ionen sind als lila Kugeln dargestellt (der Kristall wuchs mit  $Mg^{2+}$ -Ionen, die kurz vor der Datensammlung durch die schwereren  $Mn^{2+}$ -Ionen ausgetauscht wurden).<sup>[149]</sup>

#### 4.4 Inhibitoren

Prinzipiell bietet die PKA für potentielle Inhibitoren eine Vielzahl an Angriffspunkten. Die meisten für Kinasen entwickelten Inhibitoren binden als ATP-kompetitive Inhibitoren in der ATP-Bindetasche.<sup>[153-155]</sup> Darüber hinaus kann auch die Substraterkennungsstelle als Angriffspunkt genutzt werden. So wurden bereits Verbindungen synthetisiert, welche sowohl die ATP-Bindetasche wie auch die Substraterkennungsstelle adressieren.<sup>[156]</sup> Neben der katalytischen Untereinheit kann auch die regulatorische Domäne als Angriffspunkt dienen. Hier bieten sich die cAMP Bindestelle ebenso wie die AKAP-Bindestelle als mögliche Ziele an.

Als Zielprotein für die Arzneistoffentwicklung ist die PKA aufgrund ihrer vielfältigen Bedeutung in grundlegenden physiologischen Prozessen eher ungeeignet. Da die PKA die mit Abstand am besten untersuchte Kinase ist, dient sie oft als Modell für Kinasen. Anhand der PKA lassen sich mit verhältnismäßig wenig Aufwand neue Prinzipien testen, um sie später auf andere krankheitsrelevante Kinasen zu übertragen.

In dieser Arbeit dient die PKA als Modellprotein, um zu zeigen, dass es möglich ist, ausgehend von einem kleinen Sondenmolekül hochaffine Inhibitoren aufzubauen.



## 5 Proteinkinase A – Ergebnisse

Während die Projekte auf Endothiapepsin darauf ausgerichtet waren, den Bindemodus verschiedener Inhibitoren aufzuklären um damit Startstrukturen für ein weiteres Wirkstoffdesign zu erhalten, liegt der Fokus dieses Projekts auf dem Optimieren einer solchen Startstruktur.

Im folgenden Kapitel wird das erfolgreiche Design eines affinen Inhibitors ausgehend von dem Sondenmolekül Phenol vorgestellt.

Alle hier durchgeführten Arbeiten wurden mit der katalytischen alpha-Untereinheit der humanen PKA vorgenommen. Die meisten in der Literatur beschriebenen Arbeiten beziehen sich auf das Rinder- oder Mausprotein. So ist, neben den im Rahmen dieser Arbeit gewonnen Strukturen, bislang lediglich eine Kristallstruktur der katalytischen Untereinheit der human PKA in der Proteindatenbank verfügbar (PDB Code: 3MVJ, Stand: 09/2011)<sup>[157]</sup>. Allerdings unterscheidet sich die humane PKA von dem des Rinds oder der Maus gewonnen Protein lediglich in einigen wenigen Aminosäuren.

## 5.1 Phenol als Startpunkt für ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign

### Von einer Sonde zu einem affinen Liganden

Die hier dargestellten Ergebnisse sind Bestandteil eines Manuskripts für eine Publikation mit dem Titel „From Probe to Fragment and Lead: A Combined Approach of Experimental and Computational De Novo Design“. Das Projekt wurde zusammen mit Tobias Craan, der die computerbasierten Methoden durchgeführt hat, angefertigt. Im Rahmen dieser Arbeit entstanden insbesondere die Kristallstrukturen. Die Assaymessungen wurden in Zusammenarbeit mit unseren Kooperationspartnern der Firma Merck durchgeführt.

Die in diesem Kapitel vorgestellte PKA-Phenol Komplexstruktur wurde bereits in der Publikation mit dem Titel „Experimental Active Site Mapping as a Starting Point to Fragment-based Lead Discovery“ veröffentlicht.<sup>[109]</sup>

#### 5.1.1 Einleitung

Ein strukturbasiertes Wirkstoffdesign baut in den meisten Fällen auf einem Treffer aus einem High-Throughput-Screen auf. Während diese Verbindungen meist bereits annähernd die angestrebte Größe eines Arzneistoffs aufweisen, wurden in den letzten Jahren auch die Verwendung von deutlich kleineren Fragmente zum Screening populär (siehe dazu auch Kapitel 1.1 und 1.2). Alternativ zu den Screening-Methoden gibt es das Konzept des De-Novo-Designs. Hier wird der initiale Ligand nicht durch ein Screening identifiziert sondern vollständig am Computer entworfen. Allerdings setzt diese Vorgehensweise ein hohes Verständnis für Protein-Ligand Wechselwirkungen voraus. Da diese nach dem heutigen Stand der Wissenschaft noch vergleichsweise rudimentär verstanden sind, ist ein reines De-Novo-Design kaum durchführbar.

In dieser Arbeit soll exemplarisch gezeigt werden, dass sehr kleine Moleküle, so genannte Sonden, mit Hilfe von computergestützten Methoden, die auch bei einem De-Novo-Design eingesetzt werden erfolgreich zu hochaffinen Liganden ausgebaut werden können. Das Design wird dabei durchgehend von kristallographischen Untersuchungen begleitet. Ein solches Vorgehen kann somit als ein experimentell unterstütztes De-Novo-Design angesehen werden. Die PKA ist die mit Abstand am besten untersuchte Kinase und dient hier als einfach zu handhabendes Modellsystem für diese momentan stark beforschte Proteinklasse.

### 5.1.2 Die PKA-Phenol Komplexstruktur als Startpunkt

Sonden sind sehr kleine Moleküle, die lediglich eine schwache, unspezifische Bindung an Proteine aufweisen. Diese Eigenschaften machen es schwierig bis nahezu unmöglich die Bindung mit den klassischen Assay-Methoden nachzuweisen. Darüber hinaus zeichnen sich Sonden dadurch aus, dass sie an eine Vielzahl unterschiedlicher Proteine binden und somit als allgemeine Testmoleküle genutzt werden können, um bevorzugte Bindebereiche innerhalb der Bindetasche aufzuzeigen. Das Ausleuchten der Bindetasche mit Sondenmolekülen ist vergleichbar mit dem „active-site“ Mapping (engl: Kartierung der aktiven Stelle) das von Programmen wie z.B. GRID, MCSS, DrugScore oder SuperStar durchgeführt wird.<sup>[158-161]</sup>

Da wir in vorhergehenden Experimenten Phenol bereits als ein Sondenmolekül benutzt hatten, welches zumindest in unseren Screenings an eine Vielzahl an Proteinen bindet, haben wir uns entschlossen, auch eine Kristallstrukturbestimmung der PKA im Komplex mit Phenol zu versuchen. Neben organischen Verbindungen wie Phenol kann auch das universell vorkommende Wasser als Sonde angesehen werden.

Um einen PKA-Phenol Komplex zu erhalten wurde ein PKA Kristall für etwa 15 Minuten in einer Lösung mit 200 mM Phenol aufbewahrt. Zuvor wurde der Kristall für eine Stunde mit Glutaraldehyd vernetzt um eine bessere Kristallstabilität zu erreichen. Der so erhaltene Kristall wurde am SLS (Swiss Light Source) vermessen und lieferte einen Datensatz mit einer Auflösung von 2.00 Å. Insgesamt konnten drei gebundene Phenol Moleküle identifiziert werden. Die entsprechenden Differenzelektronendichten sind in Abbildung 5.1 gezeigt. Vorhergehende Experimente mit einer Phenolkonzentration von lediglich 10 mM zeigten kein eindeutig gebundenes Phenol. Alle im Folgenden vorgestellten Kristallstrukturen enthalten ein PKI Bruchstück (Proteinkinase Inhibitor Aminosäuren 5-24), welches als Pseudosubstrat an die Substratbindestelle bindet. PKI stabilisiert das Protein in einer halboffenen Konformation und ermöglicht so eine einfache Kristallisation.

In der ATP-Bindetasche sind zwei Phenolmoleküle gebunden. Eines adressiert die Scharnierregion, indem es mit dem Carbonylsauerstoff von Glu121 und dem Rückgrat Stickstoff von Thr123 eine Wasserstoffbrücke eingeht. Das zweite sitzt in der Zuckertasche und interagiert dort, analog der Hydroxygruppe des Ribosebausteins von ATP, mit Glu127. Ein drittes Phenolmolekül befindet sich in einer hydrophoben Tasche der kleinen Domäne. Die Hydroxygruppe dieses Phenols ist in der Dichte nur schlecht definiert und zeigt in das umgebende Solvens ohne eine polare Interaktion einzugehen (auch nicht mit symmetrieäquivalenten Molekülen der Kristallpackung).

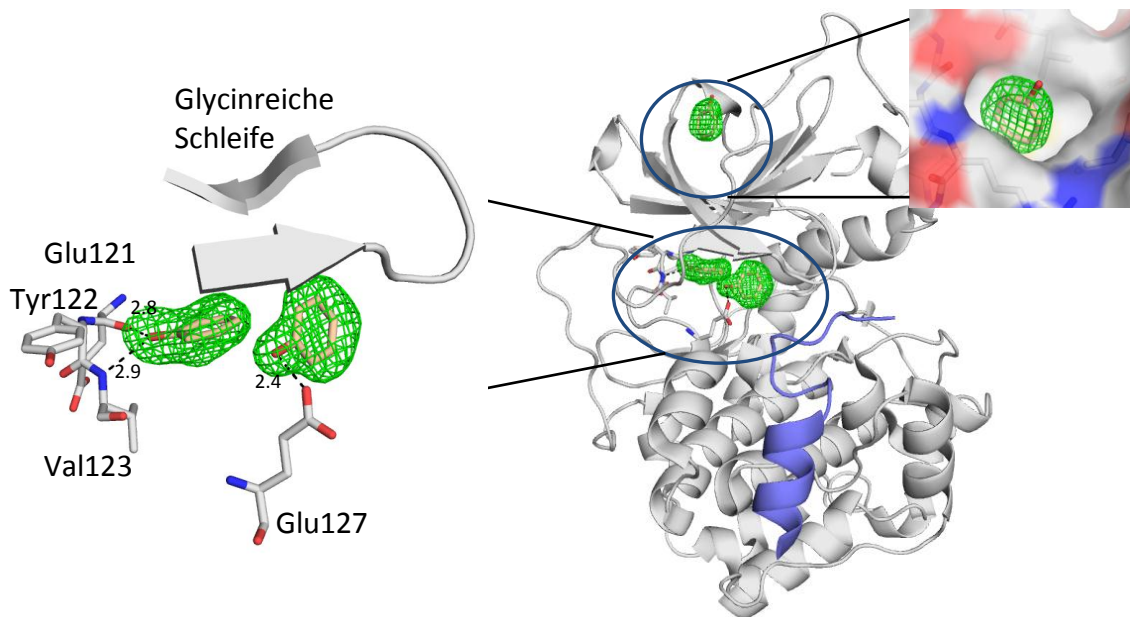


Abbildung 5.1 Die drei in der PKA gebundenen Phenolmoleküle. 2 Moleküle haben in der ATP-Bindetasche gebunden, ein weiteres in einer hydrophoben Tasche an der Proteinoberfläche. In grün ist die Differenzelektronendichte  $mF_o-DF_c$  bei  $2.0 \sigma$  dargestellt. PKI ist in blauer *Cartoon*-Darstellung gezeigt während die restlichen Aminosäuren weiß eingefärbt sind.

In vielen Strukturen wird die hydrophobe Tasche, die das dritte Phenol besetzt, von Arg45 ausgefüllt. Die hier gefundene Konformation von Arg45 findet sich allerdings auch in Strukturen in denen die hydrophobe Tasche unbesetzt bleibt (z.B. PDB-Code: 1ATP).<sup>[149]</sup> In Abbildung 5.2 sind zwei der möglichen Konformation von Arg45 dargestellt.

Auffällig an der hier vorgestellten Komplexstruktur ist die Konformation der glycinreichen Schleife. Abbildung 5.2 zeigt die hier gefundene sowie die geschlossene Konformation in Anwesenheit von ATP im Vergleich. Die hier gefundene Position der glycinreichen Schleife ist noch weiter geschlossen und mit der Anwesenheit von ATP nicht vereinbar. Ser53 geht in dem PKA-Phenol-Komplex zwei Wasserstoffbrücken mit Asp184 ein. In der geschlossenen Form findet sich lediglich eine Interaktion zu Ala21 von PKI, in weiter geöffneten Konformation geht Ser53 keine Interaktionen zum Protein mehr ein.

Kristallographisch erwähnenswert ist das Lys292 mit Glutaraldehyd umgesetzt vorliegt. Dies ist auf die verhältnismäßig lange Vernetzungszeit von einer Stunde zurückzuführen.

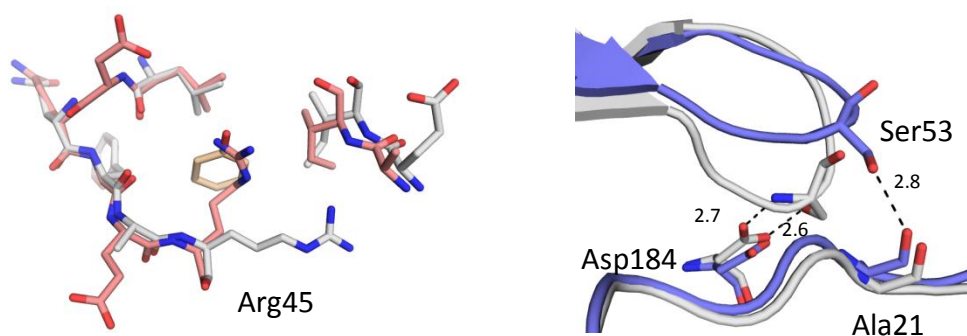


Abbildung 5.2: Links: Arg45 kann die hydrophobe Tasche anstelle des Phenols besetzen. Mit weißen Kohlenstoffatomen ist der PKA-Phenol Komplex dargestellt, mit roten Kohlenstoffatomen der PKA-SB68 Komplex. Rechts: Die Konformation der glycinreichen Schleife im Vergleich mit der bislang bekannten am weitesten geschlossenen Konformation in Gegenwart von ATP. In weiß ist der PKA-Phenol Komplex gezeigt, in blau der Komplex mit MnATP (PDB-Code: 1ATP).<sup>[149]</sup>

Zusätzlich zu dem experimentellen Ansatz wurden bevorzugte Binderegion in der ATP-Bindetasche mit HotspotX (früher: Drugscore<sup>CSD</sup>) berechnet.<sup>[162]</sup> Die Karten wurden sowohl für einen aromatischen Kohlenstoff wie auch für eine phenolische Hydroxygruppe erstellt. Wie in Abbildung 5.3 zu sehen ist, stimmen die errechneten bevorzugten Positionen dieser Atomtypen mit den experimentell bestimmten Phenol-Positionen gut überein.

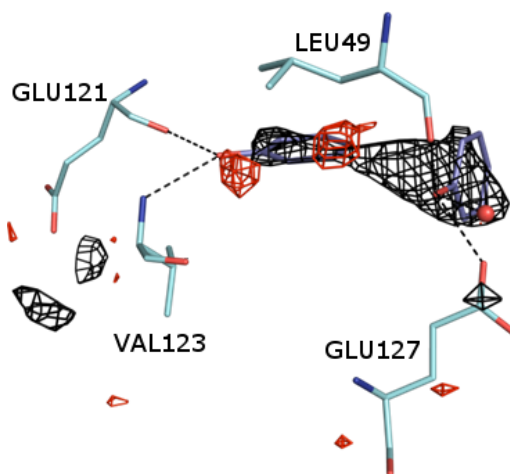


Abbildung 5.3: Berechnete bevorzugte Positionen für aromatische Kohlenstoffe C.ar (schwarz) sowie phenolische Hydroxygruppen O.ph (rot). Protein-Kohlenstoffatome sind hellblau, die von Phenol violett dargestellt.

### 5.1.3 Von Phenol zu einem Fragment

Ausgehend von der initialen Phenol-Bindegeometrie wurde mit Hilfe des Computers nach besser passenden Phenolderivaten mit geeigneten Substituenten gesucht. Durch

die Beschränkung auf Phenole wurde gewährleistet, dass die Adressierung der Scharnierregion erhalten bleibt.

Dazu wurde eine Testbibliothek mit 4000 käuflichen Fragmenten durchmustert. Jedes dieser Fragmente wies ein Ring mit mehreren Substituenten auf und erfüllte die Kriterien der von Congreve et al. definierten Dreierregel.<sup>[13]</sup> Die Fragmente wurden mit dem Programm FlexX<sup>[85]</sup> in die Bindetasche eingepasst. Dabei wurden die beobachteten Phenol-Bindegeometrien wie auch die HotspotX Karten als Richtlinien berücksichtigt. Es wurde versucht, die Bindung der so erhaltenen best-bewerteten Phenolderivate an PKA mittels SPR zu validieren. Allerdings konnte auf diese Weise für keines dieser Fragmente (und auch nicht für Phenol) eine Bindung nachgewiesen werden, was auf eine Affinität jenseits von 2 mM hinweist.

Fünf Phenolderivate wurden für weitere kristallographische Untersuchungen ausgesucht. Für 2-Methyl-4-Acetylphenol konnte eine Kristallstruktur erhalten werden.

2-Methyl-4-Acetylphenol wurde für 15 Minuten in einer Konzentration von 10 mM in PKA Kristalle eindiffundiert. Für eine bessere Stabilität wurde der Kristall zuvor für eine Stunde mit Glutaraldehyd quervernetzt. Der Datensatz wurde am SLS (Swiss Light Source) gesammelt und weist eine Auflösung von 2.00 Å auf. Im Gegensatz zu Phenol hat lediglich ein Molekül in der Bindetasche gebunden. Abbildung 5.4 zeigt die Differenzelektronendichte sowie die Interaktionen. Die phenolische Hydroxygruppe bildet, analog dem unsubstituierten Phenol, zwei Wasserstoffbrücken zur Scharnierregion aus. Die Methylgruppe ist in Richtung einer hydrophoben Nische orientiert. Der Acetyl-Sauerstoff bildet über zwei Wassermoleküle eine Wechselwirkung zu dem Rückgrat von Asp184 sowie zur Aminogruppe von Lys72. Während in der Phenolstruktur die glycinreiche Schleife in einer tief geschlossenen Position beobachtet wurde, befindet sich diese Schleife hier in der halboffenen Konformation wie sie in den meisten Kristallstrukturen der PKA mit PKI angetroffen wird.

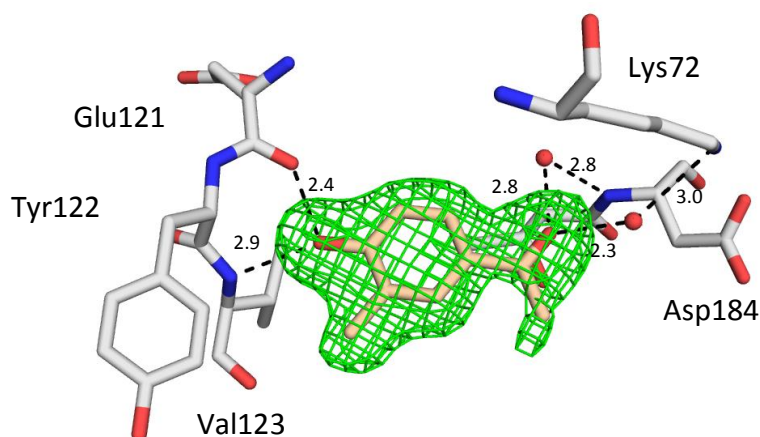


Abbildung 5.4: Der Bindemodus von 2-Methyl-4-Acetylphenol. In grün ist die Differenzelektronendichte  $mF_o-DF_c$  bei 2.0  $\sigma$  gezeigt.

Der Vergleich mit der Phenol-Komplexstruktur zeigt, dass der grundsätzliche Bindemodus, wie gewünscht, erhalten blieb. Die Position des Rings ist ein wenig verschoben und durch die Anwesenheit der Acetylgruppe bildet sich in dieser Region ein zu der Phenolstruktur verschiedenes Wassernetzwerk aus (Abbildung 5.5).

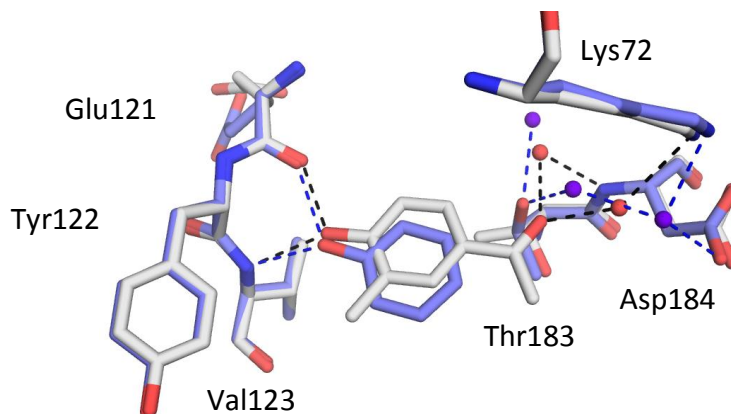


Abbildung 5.5: Vergleich der Komplexstruktur von 2-Methyl-4-Acetylphenol (Kohlenstoffatome weiß, Wasser rot, Interaktionen schwarz) mit der von Phenol (Kohlenstoffatome blau, Wasser lila, Interaktionen blau).

#### 5.1.4 Expansion zu einer Leitstruktur

Um das weitere Design zu planen wurden mit HotspotX die bevorzugten Bindestellen für aromatische Gruppen sowie für Wasserstoffbrücken-Akzeptoren berechnet. Wie in Abbildung 5.6 zu sehen ist, wurde neben den bevorzugten Bindebereichen an der Scharnierregion unter der glycinreichen Schleife eine weitere vorteilhafte Position für aromatische Reste identifiziert. Auch für Wasserstoffbrücken-Akzeptoren finden sich in diesem Bereich günstige Positionen. Für diese werden zudem in der Nähe von Lys72 gute Interaktionsmöglichkeiten vorhergesagt.

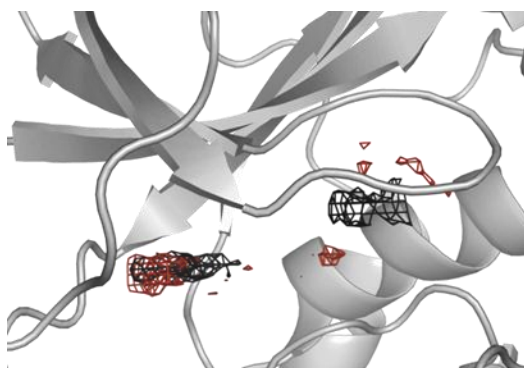


Abbildung 5.6: Mit HotspotX berechnete Karten für aromatische Reste (in schwarz, bei einem Level von -100000 bis -193546 (52%)) sowie für den Atomtyp O.co2 repräsentativ für Wasserstoffbrücken-Akzeptoren (in rot, bei einem Level von 7500 bis 23475 (32%)).

Basierend auf diesen Informationen wurde folgende Desingstrategie erarbeitet: Ein die Scharnierregion adressierender Phenolbaustein soll in ortho Position mit einem hydrophoben Substituenten versehen werden (z.B. Methyl, Chlor, Methoxy oder ein fusioniertes Ringsystem). Ein vier Atome langer Linker in para-Position soll den Abstand zu der mit HotspotX gefunden Binderegion für aromatische Reste überbrücken. Am Ende soll dieser Linker eine Carbonylgruppe aufweisen um mit Lys72 zu interagieren. Diese Interaktion orientiert sich an dem in der Komplexstruktur mit 2-Methyl-4-Acetylphenol gefunden Wassermolekül, welches die Interaktion zwischen dem Liganden und Lys72 vermittelt, sowie der mit HotspotX gefundenen Bindestelle an dieser Position. Dabei sollte das entstehende Grundgerüst chemisch zugänglich und die benötigten Bausteine in möglichst vielfältigen Variationen erhältlich sein.

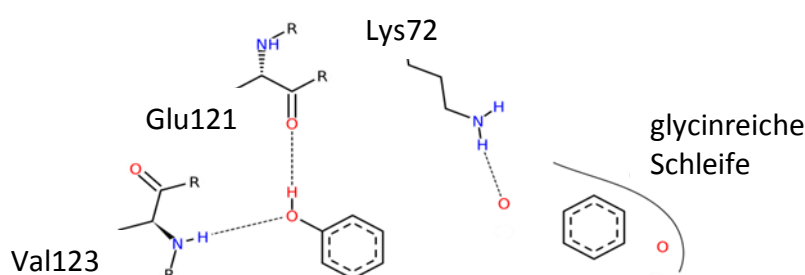


Abbildung 5.7: Schematische Darstellung der Design Strategie

Als zentrale Gruppe haben wir uns für substituierte Hydrazone entschieden. Der Teil unterhalb der glycinreichen Schleife sowie bei Lys72 kann dann von verschiedenen Phenylelessigsäurederivaten repräsentiert werden. Der Hydrazon-Linker wird durch ein Hydrazin eingeführt, das mit dem Carboxylat der Phenylelessigsäure umgesetzt wird. Diese monosubstituierten Hydrazide können anschließend mit verschiedenen 4-Hydroxybenzaldehyden, der Baustein, welcher die Scharnierregion adressiert, zu den gewünschten Hydrazonen reagieren. Diese verhältnismäßig einfache Synthesstrategie bietet somit die Möglichkeit die Bausteine unter der glycinreichen Schleife und an der Scharnierregion einfach zu variieren.

Um die erste Serie zu synthetisieren wurden die besten Verbindungen mit unserem kürzlich vorgestellten KNOBLE Ansatz ausgewählt.<sup>[163]</sup> Es wurden etwa 200 mögliche Kandidaten am Computer zusammengestellt und mit FlexX in die ATP-Bindetasche eingepasst. Die fünf am besten bewerteten Verbindungen wurden anschließend synthetisiert und auf ihre Aktivität gegen die PKA getestet. In einem SPR-Assay wurden Affinitäten zwischen 1 und 120  $\mu\text{M}$  bestimmt (Tabelle 5.1). Dabei ist zu beachten, dass die Verbindungen aufgrund der Doppelbindung der Hydrazongruppe als E/Z-Gemisch vorliegen, wobei aus sterischen Gründen lediglich für das E-Enantiomer eine Bindung an das Protein angenommen wird.



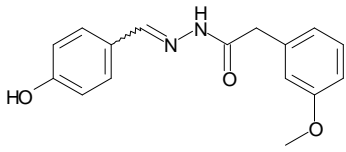
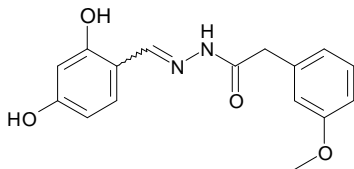
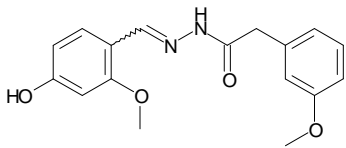
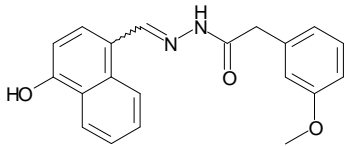
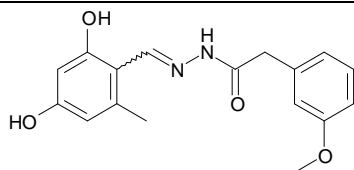
ID	Struktur	K <sub>D</sub> [μM]	LE [kcal]
SB47		70	0.27
SB65		35	0.28
SB66		>100	
SB67		15	0.26
SB68		6.5	0.31

Tabelle 5.1: Die mittels SPR bestimmten Affinitäten der ersten 5 Verbindungen. Zusätzlich ist die Ligandeffizienz (LE) angegeben (Die Ligandeffizienz ist ein Maß die Affinität im Verhältnis zur Molekülgröße).<sup>[16]</sup>

Von zwei dieser Verbindungen, SB47 und SB68, gelang es eine Kristallstruktur zu erhalten. Die Ligandkonzentration beim Soaking betrug in beiden Fällen 10 mM wobei auf ein vorheriges Quervernetzen der Kristalle verzichtet werden konnte. Der Kristall im Komplex mit SB47 wurde am SLS (Swiss Light Source) vermessen und erreichte dort eine Auflösung von 1.58 Å, während der Datensatz des Kristalls im Komplex mit SB68 am BESSY (Berliner Elektronenspeicherring-Gesellschaft für Synchrotronstrahlung) aufgenommen wurde und eine Auflösung von 1.60 Å zeigt. In der Komplexstruktur von SB47 konnte in der Nähe der Bindetasche noch ein gebundenes Molekül L-(+)-2,3 Butandiol aus der Kryolösung identifiziert werden (Abbildung 5.9).

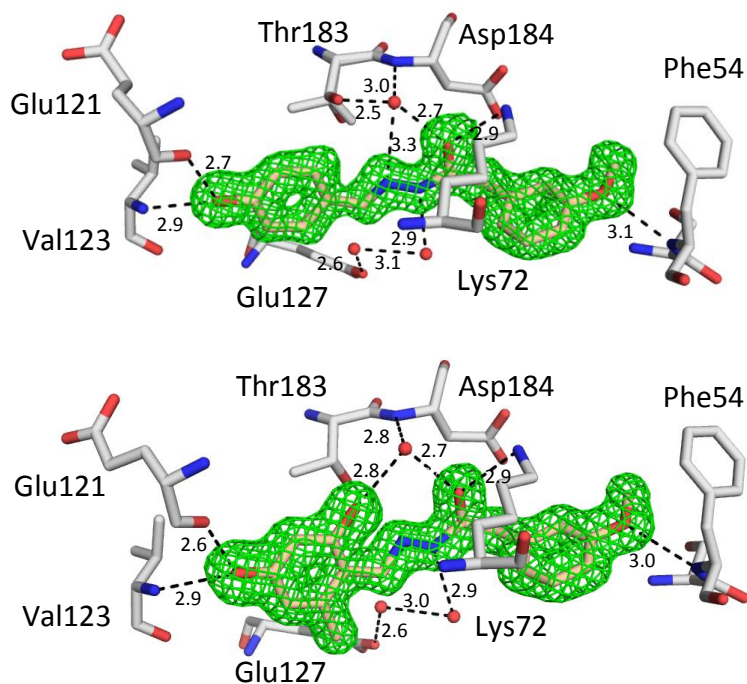


Abbildung 5.8: Der Bindemodus von SB47 (oben) sowie SB68 (unten). In grün ist jeweils die Differenzelektronendichte  $mF_o - DF_c$  bei  $3.0 \sigma$  angegeben.

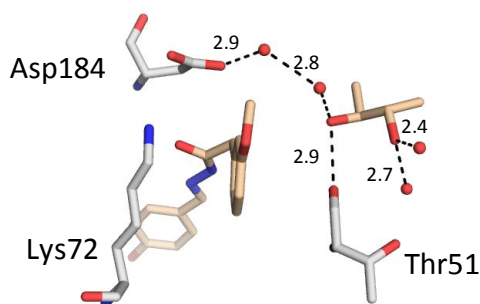


Abbildung 5.9: Position des Butandiols.

Die Verbindungen dieser Serie unterscheiden sich lediglich durch die Substitution am Ringsystem, welches die Scharnierregion adressiert. Dabei wird diese Region von SB47 und SB68, wie erwartet, vergleichbar zu Phenol und 2-Methyl-4-Acetylphenol angesprochen. SB47, welches in der meta-Position keinen Substituenten aufweist, erreicht im Assay eine Affinität von  $70 \mu\text{M}$ . Das Einführen einer zusätzlichen Hydroxygruppe in der meta-Position führt zu einer Affinitätssteigerung um den Faktor 2 (SB65,  $35 \mu\text{M}$ ). Eine weitere Methylgruppe steigert die Affinität nochmals auf einen Wert von  $6.5 \mu\text{M}$ . Anhand der Kristallstrukturen von SB47 sowie SB68 zeigt sich, dass durch die Einführung der Hydroxygruppe über ein Wasser vermittelt, eine zusätzliche Interaktion zu dem Rückgratstickstoff von Thr183 aufgebaut wird. Die metaständige Methylgruppe hingegen scheint gut geeignet zu sein um die hydrophobe

Nische neben der Scharnierregion auszufüllen. Eine Methoxygruppe an dieser Stelle scheint einer Bindung entgegenzustehen (SB66,  $K_i > 100 \mu\text{M}$ ). Computersimulationen legen nahe, dass dieser Rest in der Bindetasche nicht die bevorzugte zu dem Phenylring koplanare Orientierung annehmen kann. Für den Naphthylrest (SB67,  $15 \mu\text{M}$ ) legen diese Simulationen nahe, dass dieser zu groß ist, um die hydrophobe Tasche optimal zu besetzen.

Die Interaktionen der Liganden in den beiden Kristallstrukturen sind, bis auf die des variierten Phenolrests, nahezu identisch und entsprechen dem erwarteten Bindemodus. So geht der Carbonylsauerstoff eine Interaktion mit Lys72 ein und der zweite hydrophobe Ring bindet, wie erhofft, in der Region der glycinreichen Schleife, wo er den durch HotspotX vorhergesagten bevorzugten Bindebereich für aromatische Kohlenstoffe gut ausfüllt. Die Überlagerung der 2-Methyl-4-Acetylphenol Komplexstruktur mit der SB47-Komplexstruktur zeigt neben einer guten Überstimmung bei der Adressierung der Scharnierregion, dass sich der Carbonylsauerstoff von SB47 nahezu exakt ( $0.4 \text{ \AA}$  entfernt) an der Position befindet, an welcher sich in der 2-Methyl-4-Acetylphenol-Komplexstruktur das Wasser befindet, das die Interaktion zwischen dem Fragment und Lys72 vermittelt (Abbildung 5.10 links). Die rechte Seite von Abbildung 5.10 zeigt die von HotspotX erstellten Konturkarten auf Grundlage der SB47-Komplexstruktur, wobei der Ligand vor der Berechnung entfernt wurde. Die gute Übereinstimmung mit dem Liganden unterstreicht die Vorhersagekraft dieser Methode.

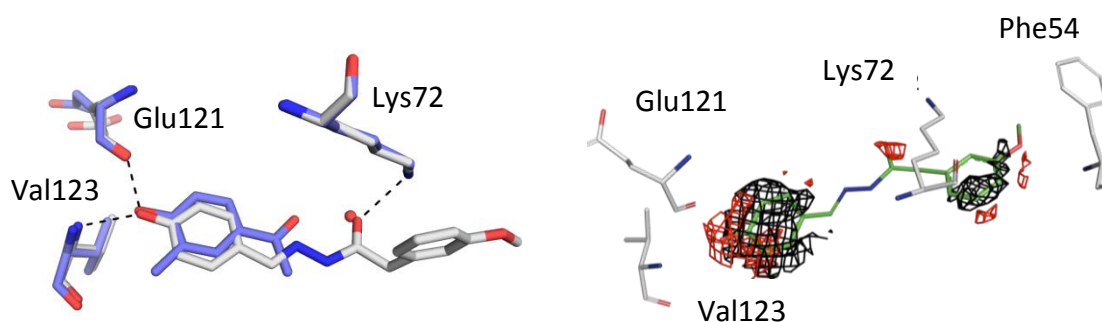


Abbildung 5.10: Links: Überlagerung der 2-Methyl-4-Acetylphenol Komplexstruktur (blaue Kohlenstoffatome) mit der SB47-Komplexstruktur (weiße Kohlenstoffatome). Rechts: Die mit HotspotX berechneten Konturkarten für aromatische Kohlenstoffe (schwarz) sowie Wasserstoffbrücken-Akzeptoren (rot). SB47 ist hier mit grünen Kohlenstoffatomen dargestellt.

Wird die Affinität des Liganden ohne eine meta-ständige Substitution (SB47) mit den verschieden substituierten Liganden dieser Serie verglichen, so kann eine Affinitätssteigerung von dem zweistellig in den einstellig  $\mu\text{M}$  Bereich beobachtet werden. Somit wurde durch ein optimales Substitutionsmuster eine Affinitätssteigerung um etwa den Faktor 10 erreicht. Die Ligandeffizienz konnte gleichzeitig von  $0.27$  auf  $0.31 \text{ kcal/mol}$  pro Schweratom gesteigert werden.

### 5.1.5 Ausbau der ersten Leitstrukturen

Um die Affinität weiter zu steigern, bietet es sich an Asp184 durch einen geeigneten Substituenten zu adressieren. Dafür eignet sich z.B. das Einfügen einer Aminogruppe am Liganden, welche dann eine Salzbrücke mit dem Protein ausbilden könnte. Um dies zu erreichen kann eine primäre Aminogruppe am Grundgerüst eingefügt werden. Abbildung 5.11 zeigt die gewünschte zusätzliche Interaktion. Die neu eingeführte Aminogruppe sollte in der Lage sein eine Salzbrücke zu dem benachbarten Glu184 auszubilden.

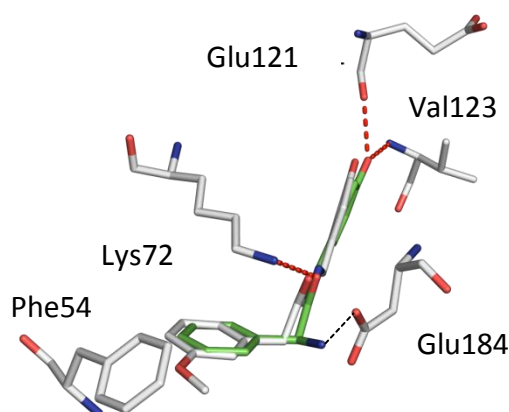


Abbildung 5.11: Die Designidee des zweiten Synthesesyklus. Mit weißen Kohlenstoffatomen ist die SB47-Komplexstruktur gezeigt. Mit grünen Kohlenstoffen ist der geplante neue Ligand dargestellt. Durch die zusätzliche Aminogruppe soll eine Salzbrücke zu Glu184 gebildet werden. Die Interaktionen von SB47B sind rot dargestellt, die geplante Salzbrücke ist in schwarz gezeigt.

Für die vielversprechendsten Bausteine zum Adressieren der Scharnierregion wurden entsprechende Amin-Derivate synthetisiert. Das Einführen der Aminogruppe generierte ein neues Stereozentrum. Durch das Computerprogramm FlexX wurden die S-Phenylglycin-Derivate als die aktiven Verbindungen vorhergesagt. Da die Synthese hierzu die entsprechenden  $\alpha$ -Aminosäuren benötigt, war die Verfügbarkeit des Startmaterials ein ausschlaggebender Punkt. Aus diesem Grund haben wir in der nachfolgenden Serie auf die meta-ständige Methoxygruppe der Phenylelessigsäure verzichtet und für beide Stereoisomere die unsubstituierten Verbindungen synthetisiert. Auf diese Weise konnten enantiomerenreine Ausgangsverbindungen verwendet werden.

In Tabelle 5.2 sind mittels SPR bestimmte Affinitäten der synthetisierten Verbindungen wiedergegeben. Leider konnte die Affinität nicht, wie erhofft, gesteigert werden und liegt immer noch im einstellig mikromolaren Bereich. Allerdings konnte in den meisten Fällen die Ligandeffizienz verbessert werden. So zeigt die Gegenüberstellung zweier vergleichbarer Verbindungen, z.B. dass die Affinität von SB47 zu SB191 von 70  $\mu\text{M}$  auf

3,4  $\mu\text{M}$  gesteigert werden konnte. Die Ligandeffizienz verbesserte sich dabei von 0,27 auf 0,38. Ebenso konnte die Affinität von SB65 im Vergleich zu SB192 von 35  $\mu\text{M}$  auf 2.4  $\mu\text{M}$  erhöht werden bei einer zeitgleichen Steigerung der Ligandeffizienz von 0.28 auf 0.37. Von Verbindungen SB68 auf SB193 konnte mit 6.4 zu >10  $\mu\text{M}$  allerdings keine Affinitätssteigerung beobachtet werden.

Die Ligandeffizienz wurde durch ein reduziertes Molekulargewicht bei einer leicht verbesserten Affinität (aufgrund des Weglassens der Methoxygruppe sowie Einführen der Aminogruppe) gesteigert. Damit bietet diese Serie einen vielversprechenden Ansatzpunkt, obwohl die neu eingeführte Aminogruppe nicht den gewünschten Effekt hinsichtlich einer Affinitätssteigerung aufweist.

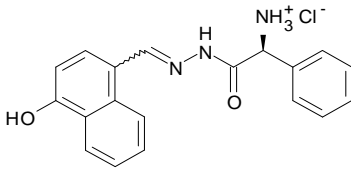
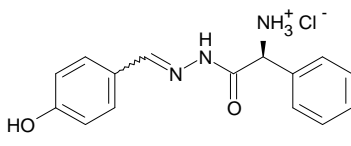
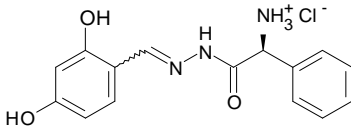
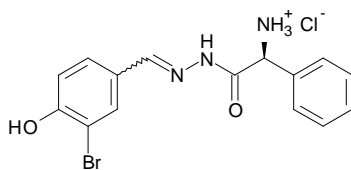
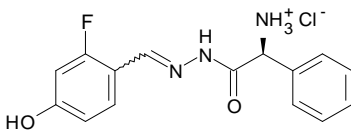
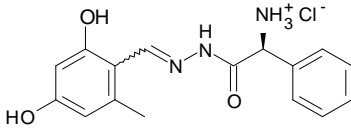
Name	Struktur	$K_D$ [ $\mu\text{M}$ ]	LE [kcal]
SB190		3.8	0.31
SB191		3.4	0.38
SB192		2.4	0.37
SB215		1.8	0.38
SB222		>10	
SB193		>10	

Tabelle 5.2: Mittels SPR bestimmte Affinitäten der Verbindungen der zweiten Serie. Von SB222 sowie SB193 konnte kein genauer Wert bestimmt werden, da der Sättigungsbereich nicht erreicht wurde.

Von zwei Verbindungen dieser Serie, SB193 sowie SB215, gelang es, eine Kristallstruktur zu erhalten. Beide Verbindungen wurden jeweils in einer Konzentration von 10 mM in PKA-Kristalle eindiffundiert, wobei auf ein vorheriges quervernetzen der Kristalle verzichtet werden konnte. Die Datensätze wurden am SLS (swiss light source) gesammelt und erreichten für SB193 eine Auflösung von 2.20 Å sowie für SB215 1.88 Å. Abbildung 5.12 zeigt den Bindemodus sowie die Differenzelektronendichte der beiden Liganden.

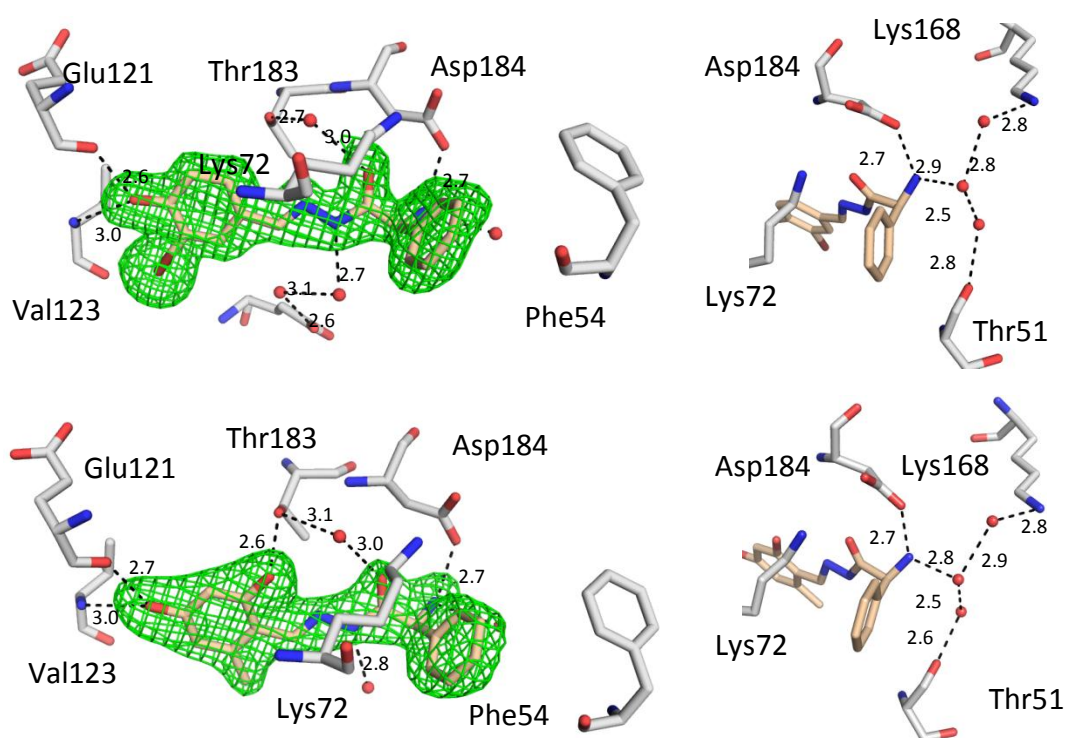


Abbildung 5.12: Bindungsmodi von SB215 (oben) sowie SB193 (unten). In grün ist die Differenzelektronendichte  $mF_o - DF_c$  bei  $3\sigma$  wiedergegeben. Während links ein Überblick über den gesamten Bindungsmodus gezeigt ist, sind rechts die Interaktionen der neu eingeführten Aminogruppe dargestellt.

Die beiden Kristallstrukturen zeigen, dass der prinzipielle Bindungsmodus, insbesondere die Adressierung der Scharnierregion erhalten geblieben ist. Die neu eingeführte Aminogruppe bildet, wie erhofft, eine Wasserstoffbrücke zu Asp184 und ist zusätzlich an einem Wassernetzwerk, welches Lys168 und Thr51 verbindet beteiligt. Allerdings wird aufgrund dieser neuen Interaktion die Wechselwirkung zu Lys72 deutlich abgeschwächt. Wie in Abbildung 5.13 zu sehen, ist die Position des Grundgerüsts der neuen Serie verglichen mit den ersten Verbindungen in Richtung Asp184 verschoben. Dadurch verlängert sich der Abstand zwischen der Carbonylgruppe des Liganden und Lys72. In den Komplexstrukturen von SB47 sowie SB68 liegt dieser Abstand mit 2.9 Å im optimalen Bereich. In der Komplexstruktur von SB215 ist dieser Abstand auf 3.3 Å verlängert, in der Struktur mit SB193 auf 3.7 Å. Auch

der aromatische Ring unterhalb der glycinreichen Schleife wurde teilweise aus seiner Position verdrängt, um die neue Interaktion zu Asp184 zu ermöglichen.

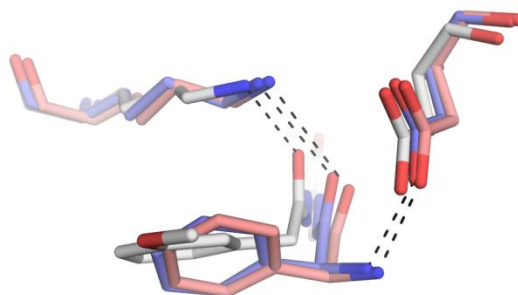


Abbildung 5.13: Vergleich der Komplexstrukturen mit SB47 (weiße Kohlenstoffatome), SB193 (rote Kohlenstoffatome) und SB215 (blaue Kohlenstoffatome)

Für die Verbindungen der ersten Serie haben wir angenommen, dass ein Großteil der Affinität aus der Wasserstoffbrücke zu Lys72 sowie den aromatischen Interaktionen des Phenylrings der Phenylelessigsäure resultiert. Bei den Liganden der zweiten Serie werden nun diese beiden Interaktionen abgeschwächt, um die neue Salzbrücke zu Asp184 zu ermöglichen. Nichtsdestotrotz konnten wir, aufgrund der leicht verbesserten Affinität sowie der fehlenden Methoxygruppe und des damit kleineren Molekulargewichts, die Ligandeffizienz etwas verbessern.

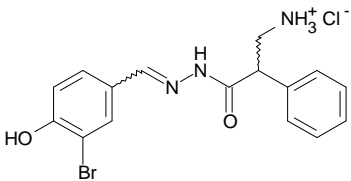
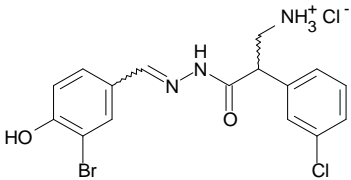
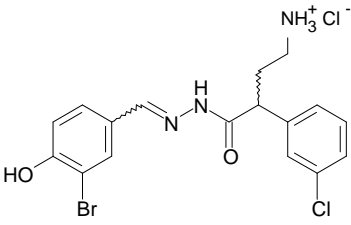
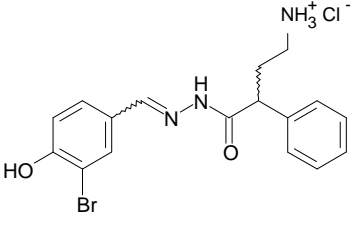
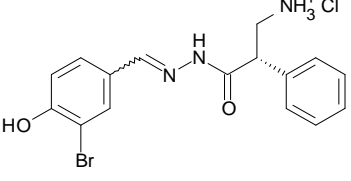
#### 5.1.6 Einführung eines Abstandshalters

Um die Vorteile der Verbindungen der ersten Serie (gute Positionierung der Carbonylgruppe sowie des Phenylelessigsäurebausteins) mit denen der zweiten Serie (gute Adressierung von Asp184) zu verbinden wurde ein Abstandshalter (*Spacer*) zusätzlich zu der in der zweiten Serie eingeführten Aminogruppe eingefügt. Als *Spacer* wurden sowohl Bausteine mit einem wie auch zwei zusätzlichen Kohlenstoffatomen eingesetzt. Auf diese Weise sollte erreicht werden, dass die primäre Aminogruppe Asp184 adressieren kann und gleichzeitig das Grundgerüst in die in der ersten Serie beobachtete optimale Position zurückkehren kann.

Zur Adressierung der Scharnierregion wurden lediglich die vielversprechendsten ortho-Brom-Phenol sowie meta-Hydroxy-Phenol Motive aus der vorhergehenden Serie berücksichtigt. Das Substitutionsmuster des zweiten Phenylrings wurde bislang nicht optimiert. Der Beitrag des Methoxy-Substituenten der ersten Liganden war, wie anhand der zweiten Serie zu erkennen, nicht überzeugend. Aus diesem Grund wurde ein meta-ständiger Chlorsubstituent eingeführt. Diese scheint geeignet zu sein um eine Chlor- $\pi$ -Interaktion mit Phe54 einzugehen.

Die enantiomerenreine Synthese der Verbindungen dieser Serie erwies sich als problematisch. In der letzten Serie konnten die als Startmaterial benötigten  $\alpha$ -Aminosäuren käuflich erworben werden. So musste lediglich die E/Z-Isomerie berücksichtigt werden. Die für die hier vorgestellten Verbindungen benötigten  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aminosäuren waren hingegen nicht kommerziell verfügbar. Da die Synthese nicht zwischen den Isomeren unterscheidet, liegen diese Verbindungen in einem Gemisch vor, welches neben der E/Z Isomerie auch beide Orientierungen des neu eingeführten chiralen Zentrums beinhaltet. Lediglich für die Darstellung von HD01 konnte eine isomerenreine Ausgangsverbindung verwendet werden.

Die mittels SPR ermittelten Affinitäten dieser Serie sind in Tabelle 5.3 zusammengefasst.

Name	Struktur	$K_D$ [ $\mu M$ ]	LE [kcal]
SB274		0.23	0.41
SB288		0.11	0.41
SB302		0.20	0.38
SB298		0.36	0.38
HD01		11	0.31



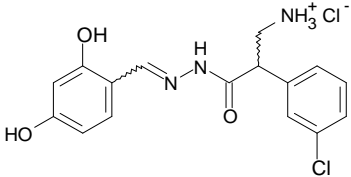
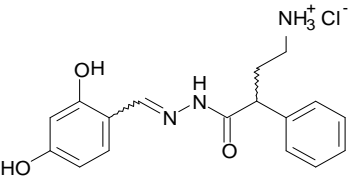
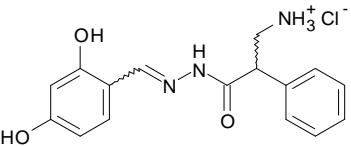
SB287		0.33	0.39
SB297		0.87	0.38
SB273		0.85	0.36

Tabelle 5.3: Die mittels SPR bestimmten Affinitäten der Verbindungen der dritten Serie sowie deren Ligandeffizienz.

Für alle Verbindungen konnte wie erhofft im Vergleich zu den Inhibitoren der zweiten Serie, eine Affinitätssteigerung beobachtet werden. Ein Vergleich der Affinitäten innerhalb dieser Serie ist auf Grund der nicht aufgeklärten Zusammensetzung der Diastereomerengemische schwierig. Trotzdem lässt sich erkennen, dass die Einführung des meta-Chlor Substituenten im Vergleich zu den unsubstituierten Verbindungen einen Affinitätsgewinn bringt (z.B. SB274 230 nM zu SB288 110 nM). HD01 weist im Gegensatz zu den anderen Verbindungen, welche racemisch vorliegen, nur eine Orientierung am chiralen Zentrum auf (S-Konfiguration). Das HD01 mit 11  $\mu$ M eine deutlich niedrigere Affinität als das racemische Analogon SB274 (230 nM) aufweist, zeigt die entscheidende Bedeutung der richtigen Konfiguration an diesem Zentrum. Da die R-Konfiguration klar bevorzugt ist, und die Z-Isomere wahrscheinlich nicht nennenswert zur Bindung beitragen, kann der Großteil der Affinität einer der vier Verbindungen des Enantiomerengemisches zugeschrieben werden. Es kann angenommen werden, dass diese aktive Verbindung hochaffin ist und eine Affinität im niedrig nanomolaren Bereich aufweist.

Von zwei Verbindungen dieser Serie, SB298 und SB302, konnte eine Kristallstruktur erhalten werden. Da bei dem Versuch, die Liganden in einen PKA-Kristall eindiffundieren zu lassen, die Kristalle selbst nach vorherigen Quervernetzen auch bei niedrigen Ligandkonzentrationen zerstört wurden, wurden die Verbindungen mit dem Protein kokristallisiert. Die Ligandkonzentration während der Kristallisation betrug dabei 2 mM. Die Kristalle benötigten mit zwei Wochen deutlich länger als gewöhnlich bis sie eine ausreichende Größe aufwiesen. Die resultierenden Datensätze wiesen im

Fälle von SB298 eine Auflösung von 2.03 Å, im Falle von SB302 eine Auflösung von 2.38 Å auf. Sowohl SB298 wie auch SB302 besitzen einen aus zwei Methylengruppen bestehenden *Spacer*. Verbindungen mit lediglich einer Methylengruppe wurden ebenfalls zur Kokristallisation angesetzt, allerdings wurden hier keine Kristalle erhalten.

SB302 unterscheidet sich von SB298 lediglich durch den meta-Chlor Substituenten. Der Bindungsmodus sowie die Differenzelektronendichte der beiden Verbindungen sind in Abbildung 5.14 zu sehen.

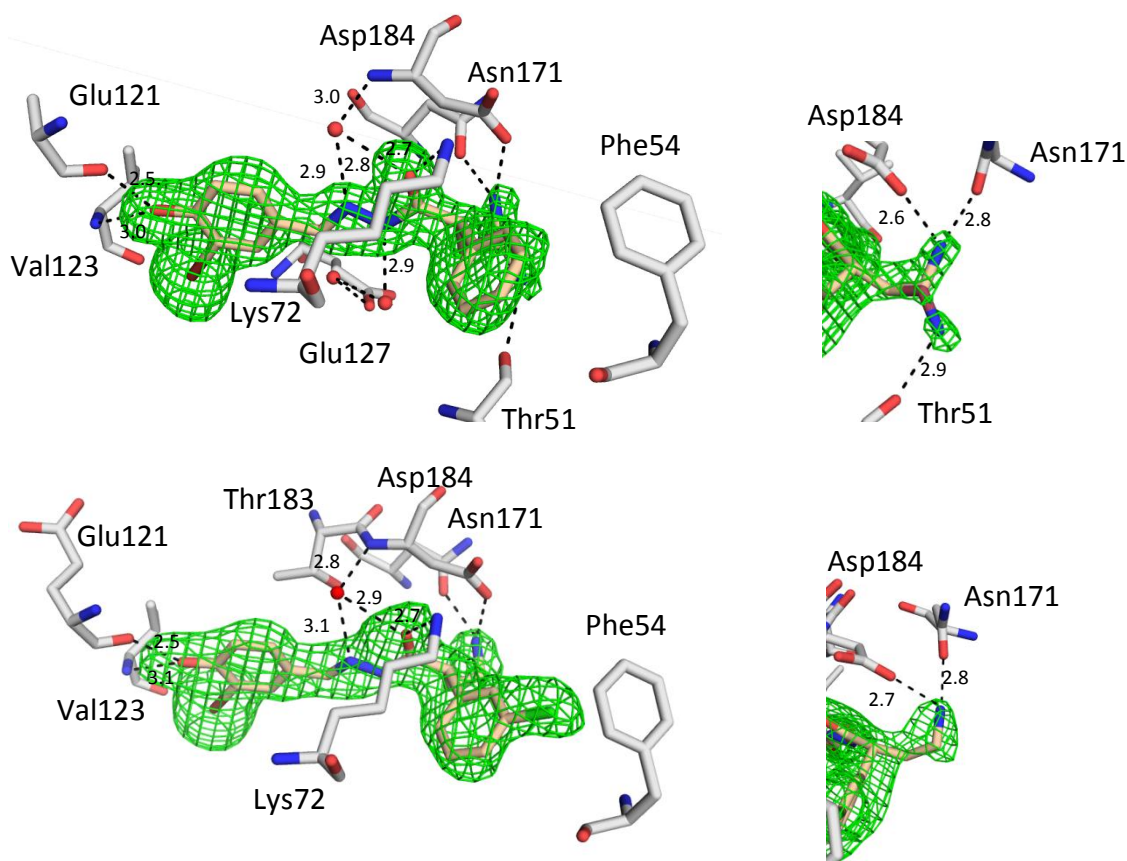


Abbildung 5.15: Der Bindemodus von SB298 (oben) sowie von SB302 (unten). Links ist jeweils der gesamte Bindemodus abgebildet während rechts die Interaktionen der Aminogruppe im Detail dargestellt sind. Die zweite Konformation der Aminogruppe von SB298 ist dunkelrot hervorgehoben. In grün ist die Differenzelektronendichte bei 3.0  $\sigma$  (SB298) bzw. 2.0  $\sigma$  (SB302) gezeigt.

In beiden Komplexstrukturen findet sich das R-Isomer des Liganden. Der grundsätzliche Bindemodus wurde auch in dieser Serie erhalten. So adressieren sowohl SB298 wie auch SB302 die Scharnierregion über ihre phenolische Hydroxygruppe. Die Carbonylfunktion bildet, wie erhofft, eine Wasserstoffbrücke zu Lys72 mit einem idealen Abstand von 2.7 Å. Die Aminofunktion findet sich in der Komplexstruktur von SB298 in zwei Konformationen. Die zu 54 % besetzte Orientierung befindet sich sowohl zu Asp184 wie auch zu Asn171 in einem Wasserstoffbrückenabstand. Die zweite

Konformation liegt zu 46 % vor. In dieser Position interagiert das Amin mit Thr51. In der Komplexstruktur von SB302 findet sich nur eine Orientierung der Aminogruppe in Richtung von Asp184 und Asn171. Allerdings ist die Auflösung mit 2.38 Å nur mittelmäßig und die Differenzelektronendichte für den die Aminogruppe tragenden Teil nur schlecht definiert, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass nicht dennoch eine weitere Orientierung vorliegt. Werden zwei Orientierungen analog der SB298-Komplexstruktur angenommen und anschließend deren Besetzung verfeinert ergibt sich eine Besetzung von 71 % zu 29 %. Da die zusätzliche Orientierung nur schwach besetzt und vor allem in der Dichte nicht eindeutig zu erkennen ist, wurde lediglich eine Konformation diesesamins in der abschließenden Verfeinerung berücksichtigt. Der neu eingeführte meta-Chlor Substituent von SB302 bildet, wie erwartet, eine Chlor- $\pi$ -Interaktion mit Phe54 aus.

Das Bromatom an dem die Scharnierregion adressierenden Phenol ist in der SB298-Komplexstruktur lediglich zu 77 % besetzt. Dies ist wahrscheinlich auf eine partielle Abspaltung durch die während der Datensammlung am Synchrotron verwendete hochenergetische Röntgenstrahlung zurückzuführen. Das Abspalten von Bromsubstituenten durch Synchrotronstrahlung wurde bereits in der Literatur beschrieben.<sup>[99]</sup>

In der Komplexstruktur von SB302 findet sich zusätzlich zu dem Liganden in der ATP-Bindetasche ein weiterer Ligand an der Position, an welcher in der Phenol-Komplexstruktur das dritte Phenolmolekül beobachtet wurde (Abbildung 5.16). Der Inhibitor besetzt die hydrophobe Tasche mit seinem Chlor-substituierten Aromaten, während der restliche Ligand lose an die Proteinoberfläche assoziiert ist, wobei keine polaren Interaktionen identifiziert werden können (auch nicht mit einem symmetrieäquivalenten Molekül). Insgesamt ist die Differenzelektronendichte dieser zusätzlichen Verbindung sehr schlecht definiert. So ist neben dem phenolischen Ringsystem auch der die Aminogruppe tragende Rest kaum zu erkennen. Die Besetzung des Liganden wurde auf 84 % verfeinert. Das Bromatom konnte in der anomalen Dichtekarte als anomaler Streuer beobachtet werden, was entscheidend zu der Positionierung des Liganden beigetragen hat. Damit kann insgesamt die gewählte Ligandposition als sehr wahrscheinlich angesehen werden. Trotzdem kann, insbesondere im Anbetracht der Tatsache, dass der eingesetzte Inhibitor als Gemisch aus mehreren Verbindungen vorlag, nicht völlig ausgeschlossen werden, dass ein anderes als das im Modell berücksichtigte Derivat gebunden hat. Aus diesem Grund wurde vorerst auf das Deponieren dieser Struktur in der Proteindatenbank verzichtet.

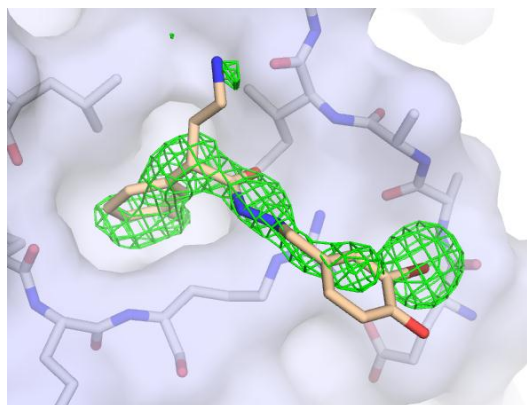


Abbildung 5.16: Ein zweites Molekül SB302 hat an der Stelle gebunden an welcher in der Phenol-PKA-Komplexstruktur das dritte Phenol zu sehen war. In grün ist die Differenzelektronendichte bei  $2.0 \sigma$  gezeigt.

Abbildung 5.17 zeigt eine Überlagerung der Verbindungen der drei Serien. Es ist zu erkennen, dass der Ligand der zweiten Serie zugunsten der Salzbrücke zu Asp184 aus seiner optimalen Position verdrängt wurde. In der dritten Serie konnte nun, durch Einführung eines Spacers, die ursprüngliche Positionierung des Inhibitors wiedererlangt werden bei gleichzeitiger Beibehaltung der Interaktion zu Asp184. Die Positionen der Grundgerüste der Verbindungen der ersten und dritten Generation stimmen nahezu perfekt überein.

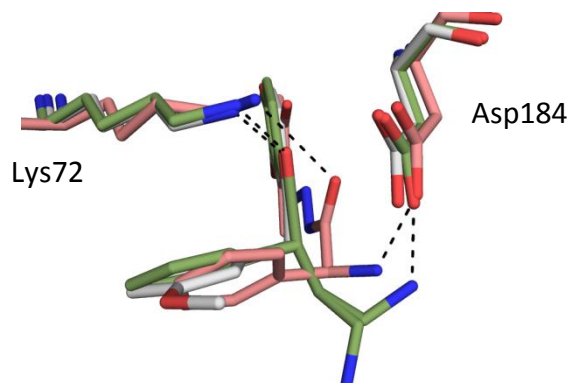


Abbildung 5.17: Überlagerung der SB47-Komplexstruktur (weiße Kohlenstoffe), der SB193-Komplexstruktur (rote Kohlenstoffe) sowie der SB298-Komplexstruktur (grüne Kohlenstoffe).

### Kristallographische Tabellen

Ligand PDB Code	Phenol 3NX8	HMA 3OOG	SB47 3OVV	SB68 3POO	SB215 3OWP
<b>Datensammlung und Prozessierung</b>					
Sammlungsort	SLS	SLS	SLS	BESSY	SLS
$\lambda$ [Å]	1.000	1.000	1.000	0.91841	1.000
Raumgruppe	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$	$P2_12_12_1$
Einheitszellparameter $a$ [Å]	72.2	72.2	75.8	72.9	72.9

b [Å]	77.1	75.8	73.2	74.9	75.7
c [Å]	79.6	80.0	80.0	79.7	80.0
Auflösung [Å]	40 – 2.00	40 – 2.00	30 – 1.58	40 – 1.60	30 – 1.88
Höchste Auflösungsschale	2.03 – 2.00	2.03 – 2.00	1.61 – 1.58	1.63 – 1.60	1.91 – 1.88
Anzahl einzelner Reflexe	30116 (1674)	30200 (1492)	61561 (2981)	57573 (2857)	36666 (1819)
R <sub>sym</sub> [%] <sup>a</sup>	4.8 (41.5)	6.0 (44.6)	3.9 (48.9)	3.9 (49.6)	6.1 (44.9)
Vollständigkeit [%] <sup>a</sup>	98.3 (83.7)	100 (100)	99.7 (98.5)	98.6 (99.5)	99.9 (99.8)
Redundanz <sup>a</sup>	6.9 (4.8)	7.3 (7.3)	4.9 (4.8)	3.4 (3.3)	4.1 (4.0)
I/σ <sup>a</sup>	37.2 (2.6)	31.2 (4.4)	37.5 (3.0)	26.7 (2.4)	22.2 (2.8)

**Verfeinerung**

Program	SHELXL	SHELXL	SHELXL	PHENIX	PHENIX
Letzter R <sub>free</sub> <sup>b</sup>	28.8	27.6	23.2	21.2	20.9
Letzter R <sub>work</sub> <sup>b</sup>	21.9	21.9	18.7	18.6	16.7
Anzahl der Wassermoleküle	109	139	332	248	313
Ramachandran Diagramm					
Bevorzugte Regionen (%)	90.2	91.2	93.6	91.9	91.6
Zusätzlich erlaubte Regionen (%)	9.5	8.8	6.4	8.1	8.4
Erweiterte erlaubte Regionen (%)	0.3	0	0	0	0
Verbotene Regionen (%)	0	0	0	0	0
Mittlere B-Faktoren (Å <sup>2</sup> )					
Proteinatome	43.4	32.4	20.3	29.3	25.4
Wassermoleküle	41.4	33.7	30.9	33.5	34.0
Ligand	40.5	30.2	16.8	17.9	22.8
RMSD Bindungslängen [Å]	0.007	0.005	0.009	0.006	0.007
RMSD Bindungswinkel [°]	1.9	2.0	2.7	1.0	1.1

<sup>a</sup> Wert in Klammern bezieht sich auf die höchste Auflösungsschale<sup>b</sup> die angegebenen R-Werte beziehen sich jeweils auf die gesamten Daten

Tabelle 5.4: Kristallographische Tabelle Teil 1

Ligand	SB193	SB298	SB302
PDB Code	3OXT	3POM	---
<b>Datensammlung und Prozessierung</b>			
Sammlungsort	SLS	BESSY	Inhouse
λ [Å]	1.000	0.91841	1.54178
Raumgruppe	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>	P2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub> 2 <sub>1</sub>
Einheitszellparameter			
a [Å]	75.8	71.9	72.9
b [Å]	73.2	76.5	75.2
c [Å]	80.0	79.5	80.1
Auflösung [Å]	30 – 2.20	30 – 2.03	40 – 2.38
Höchste Auflösungsschale	2.25 – 2.20	2.06 – 2.03	2.42 – 2.38
Anzahl einzelne Reflexe	22925 (1490)	28991 (1423)	18106 (897)
R <sub>sym</sub> [%] <sup>a</sup>	7.4 (44.4)	8.6 (47.0)	5.8 (39.8)
Vollständigkeit [%] <sup>a</sup>	99.4 (99.1)	98.9 (98.8)	99.1 (99.7)
Redundanz <sup>a</sup>	4.0 (3.9)	3.6 (3.6)	5.0 (4.8)
I/σ <sup>a</sup>	18.6 (2.9)	13.3 (2.3)	17.9 (3.2)
<b>Verfeinerung</b>			
Program	PHENIX	PHENIX	PHENIX
letzter R <sub>free</sub> <sup>b</sup>	23.9	20.5	23.9
letzter R <sub>work</sub> <sup>b</sup>	17.3	17.0	18.4
Anzahl Wassermoleküle	232	218	130
Ramachandran Diagramm			
Bevorzugte Regionen (%)	91.3	92.9	90.3

Zusätzlich erlaubte Regionen (%)	8.7	7.1	9.7
Erweiterte erlaubte Regionen(%)	0	0	0
Verbotene Regionen(%)	0	0	0
Mittlere B-Faktoren ( $\text{\AA}^2$ )			
Proteinatome	29.5	29.6	28.4
Wassermoleküle	34.4	33.8	28.3
Ligand	25.4	31.7	44.2*
RMSD Bindungslängen [ $\text{\AA}$ ]	0.008	0.007	0.008
RMSD Bindungswinkel [ $^\circ$ ]	1.1	1.0	1.1

<sup>a</sup> Wert in Klammern bezieht sich auf die höchste Auflösungsschale

<sup>b</sup> die angegebenen R-Werte beziehen sich jeweils auf die gesamten Daten

Tabelle 5.5: Kristallographische Tabelle Teil 2

### 5.1.7 Zusammenfassung

Die in ihrem Bindungsmodus experimentell bestimmte Sonde Phenol wurde als Ausgangspunkt verwendet um, unterstützt durch eine computerbasierte „HotSpot“ Analyse, einen hochaffinen Liganden zu entwickeln. In einer Kombination aus fragmentbasiertem und De-Novo-Design konnte eine initiale Leitstruktur mit einer Affinität von 70  $\mu\text{M}$  generiert werden. Im weiteren Verlauf wurde in drei aufeinanderfolgenden Zyklen die Affinität weiter bis in den niedrig nanomolaren Bereich gesteigert. Im ersten Designzyklus konnte durch Optimierung des Substitutionsmusters die Affinität auf 6.5  $\mu\text{M}$  verbessert werden. Im zweiten Designzyklus wurde erfolgreich eine neue Salzbrücke eingeführt, wodurch allerdings vorherige Interaktionen maßgeblich abgeschwächt wurden. Die Affinität wurde somit nicht signifikant gesteigert. Im letzten Zyklus gelang es Verbindungen zu entwerfen, welche die Interaktionen der ersten wie auch die der zweiten Serie aufwiesen. Zusätzlich wurde noch eine Chlor- $\pi$ -Interaktion eingeführt. Diese Inhibitoren erreichten eine Affinität im niedrig nanomolaren Bereich. Eine exakte Affinitätsbestimmung gestaltete sich schwierig, da die Verbindungen der letzten Serie in einem Gemisch aus vier Stereoisomeren vorlagen. Die korrekte Stereochemie konnte mittels einer Kristallstruktur identifiziert werden. Zudem konnte durch die Synthese einer Verbindung, welche die weniger vorteilhafte Orientierung am chiralen Zentrum aufwies, gezeigt werden, dass die falsche Geometrie einen Affinitätsverlust um etwa zwei Größenordnungen zur Folge hat. Dies zeigt den entscheidenden Einfluss der korrekten Stereochemie und lässt vermuten, dass lediglich eine Verbindung des Gemisches einen Großteil der Affinität begründet.

Neben der Affinität der Inhibitoren ist, speziell bei Kinasen, die Selektivität von besonderem Interesse. Da die PKA lediglich als Modellprotein dient, wurde darauf verzichtet für diese Kinase spezifische Verbindungen zu synthetisieren. Die für die Spezifität entscheidende Region um den „gatekeeper residue“ Met120 wird von den synthetisierten Verbindungen nicht adressiert. Dadurch ist davon auszugehen, dass die

Liganden auch mit weiteren Kinasen eine gute Inhibition zeigen. Es ist somit durchaus denkbar, über eine entsprechende Erweiterung des Grundgerüsts, die Verbindungen für eine spezielle Zielkinase zu optimieren.

Diese Studie zeigt demnach exemplarisch, dass es möglich ist aus kleinen unspezifischen Sondenmolekülen hochaffine Liganden zu entwickeln. Den computerbasierten Werkzeugen des De-novo-Designs kommt dabei eine bedeutende Rolle zu, indem sie den Prozess durch gezielte Vorhersagen wirksam unterstützen. Gleichzeitig wird hier auch die Notwendigkeit deutlich, ein solches Projekt kontinuierlich kristallographisch zu begleiten. Da oft bereits kleine Abweichungen von den berechneten Bindungsmodi große Auswirkungen auf die Affinität haben, ist die Kenntnis des genauen, experimentellen bestimmten Bindemodus eine Grundvoraussetzung für ein erfolgreiches Design.

Zusätzlich bietet insbesondere die im Rahmen dieses Projekts erhaltene Phenol-Komplexstruktur interessante Ansatzpunkte für weitergehende Untersuchungen. So können mittels der erstmals beobachteten tiefgeschlossenen glycinreichen Schleife neue Erkenntnisse über die Proteinflexibilität gewonnen werden. Zudem findet sich eins der drei gebundenen Phenolmoleküle in einer hydrophoben Tasche an der Proteinoberfläche. Interessanterweise findet sich in einer der Ligand-Komplexstrukturen an dieser Position ebenfalls ein weiteres gebundenes Molekül. Eine nähere Untersuchung dieser hydrophoben Tasche könnte klären, ob es sich hier eventuell um eine allosterische Binderegion handelt.

## 6 Zusammenfassung (deutsch und englisch)

### Zusammenfassung

Das strukturbasiertes Wirkstoffdesign ist eine vielgenutzte, erfolgreiche Methode neue Arzneistoffe zu entwickeln. Mit dem Ziel einen hochaffinen Inhibitor zu erhalten, wird eine Verbindung schrittweise an ein Zielprotein angepasst. Eine Grundvoraussetzung für ein solches Design ist die Kenntnis des Bindungsmodus. In der Regel wird dazu eine Protein-Ligand-Komplexstruktur herangezogen. Die Verfügbarkeit einer initialen Komplexstruktur, welche meist röntgenkristallographisch erhalten wird, ist nicht selten der zeitbestimmende Schritt.

Die kristallographische Aufklärung der Bindungsmodi unterschiedlicher Liganden ist der Schwerpunkt dieser Arbeit. Es werden insgesamt 30 Ligand-Protein Komplexstrukturen vorgestellt, die im Rahmen zweier Projekte erhalten wurden.

Das erste Projekt behandelt pepsinähnliche Aspartylproteasen als Zielproteine. Pepsinähnliche Aspartylproteasen spielen eine entscheidende Rolle bei einigen schwerwiegenden Erkrankungen, wie z.B. Malaria (Plasmepepsine), Alzheimer ( $\beta$ -Sekretase) und Bluthochdruck (Renin). Mit Endothiapepsin als Modellprotein wurden verschiedene neuartige Liganden untersucht. Auf diese Weise konnte der Bindemodus von Inhibitoren basierend auf der Gewalddreaktion und solchen mit einem Azepin- sowie Pyrrolidingrundgerüst aufgeklärt werden. Dabei wurden einige überraschende Details beobachtet. So wurden für die auf der Gewalddreaktion basierenden Inhibitoren drei grundverschiedene Bindungsmoden erhalten, in denen das katalytische Wasser in drei verschiedenen Rollen beobachtet wurde: einmal wird es verdrängt, einmal vermittelt es eine Interaktion zum Liganden als Wasserstoffbrücken-Akzeptor und einmal als Donor. Die Komplexstruktur mit einem Azepin-Derivat zeigt neben dem an die beiden Aspartate gebundenen Liganden noch zwei Bruchstücke desselben in der Bindetasche. Dadurch ist nahezu die gesamte Bindetasche besetzt, was wertvolle Hinweise auf bevorzugte Interaktionspunkte liefern kann. In der Komplexstruktur mit einem Pyrrolidin findet sich eine ungeordnete, weit geöffnete *Flap*-Region mit einer teilweise geöffneten *Flap*-Tasche. Diese Struktur gewährt damit einen Einblick in die Flexibilität dieser Proteine. Zudem konnte anhand dieses Komplexes mittels ITC eine zweifach deprotonierte katalytische Diade nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wurden Komplexstrukturen mit den klinisch relevanten HIV-Protease Inhibitoren Ritonavir und Saquinavir erhalten, wobei mit Ritonavir auch eine Komplexstruktur mit der sekretorischen Aspartylprotease 2 (SAP2) gelang. Während



der Bindemodus von Ritonavir dem in der HIV-Protease entspricht, zeigt Saquinavir eine ungewöhnliche Adressierung der katalytischen Diade.

Ein weiterer Schwerpunkt dieses Projekts ist das fragmentbasierte Design. Nachdem anhand von Benzamidin sowie eines Hydrazons gezeigt wurde, dass auch kleine Verbindungen mit schwacher Affinität erfolgreich kristallisiert werden können, wurde eine hauseigene 364 Fragmente umfassende Bibliothek gegen Endothiapepsin getestet. Von den 55 Assayhits konnte von elf Fragmenten eine Komplexstruktur erhalten werden. Die Fragmente zeigen dabei vielfältige Bindungsmodi und decken einen Großteil der Bindetasche ab. Zudem regt diese Untersuchung an, die für die Zusammenstellung vieler Fragmentbibliotheken angewandte Dreierregel, insbesondere was die Anzahl der erlaubten Wasserstoffbrücken Akzeptoren betrifft, kritisch zu hinterfragen.

Das zweite Projekt befasst sich mit der exemplarischen Optimierung einer kleinen unspezifischen Sonde zu einem hochaffinen Inhibitor. Dazu wurde die Proteinkinase A als einfach zu handhabendes Modellprotein ausgewählt. In mehreren Zyklen konnten ausgehend von Phenol durch eine Kombination der Methoden des fragmentbasierten sowie des de-novo Designs Inhibitoren mit einer Affinität im niedrig nanomolaren Bereich synthetisiert werden. Diese Studie demonstriert, wie sich experimentelle und computergestützte Methoden wirkungsvoll ergänzen. Darüber hinaus konnte erstmals eine weitgeschlossene Konformation der glycinreichen Schleife beobachtet werden, was als Ausgangspunkt für die weitere Erforschung der Dynamik dieses Proteins dienen kann.

Zusammenfassend bieten die in dieser Arbeit vorgestellten Strukturen unterschiedliche Ansatzpunkte für eine weitere Wirkstoffentwicklung. So wurde für die pepsinähnlichen Aspartylproteasen eine Vielzahl neuer Möglichkeiten zur Adressierung der katalytischen Diade aufgezeigt. Zudem helfen die hier vorgestellten Strukturen einer geöffneten *Flap* von Endothiapepsin sowie einer weitgeschlossenen glycinreichen Schleife der PKA die Dynamik dieser Proteine besser zu verstehen. Methodisch wurden neue Impulse zur Durchführung von fragmentbasierten Screenings sowie die Möglichkeit eines sondenbasierten Designs vorgestellt. Und nicht zuletzt helfen die vielfältigen Strukturen, insbesondere in Kombination mit computergestützten und weiteren biochemischen Methoden, die Natur von Ligand-Protein Wechselwirkungen besser zu verstehen.

## Summary

Structure-based drug design is a widely used, successful method in modern drug discovery. To obtain a potent inhibitor an initial lead compound is stepwise optimized to inhibit the target protein. One prerequisite is the knowledge of the binding mode which is normally provided by an X-ray crystal structure. The availability of an initial complex structure is often the time limiting step.

The main focus of this work lies on the crystallographic binding mode determination of different ligands. All together 30 protein-ligand complex structures are presented which were determined in the course of two main projects.

The first project deals with pepsin-like aspartic proteinases. These proteins play an important role in several severe diseases such as malaria (plasmeprins), Alzheimer's disease ( $\beta$ -secretase) and hypertension (renin). Endothiapepsin served as a model system to investigate the binding mode of several novel ligands. This way the binding mode of inhibitors based on the Gewald reaction, inhibitors with an azepin scaffold and pyrrolidin based inhibitors could be resolved. During this process some interesting details could be observed. In case of the inhibitors based on the Gewald reaction three distinct binding modes were obtained in which the catalytic water molecule plays three different roles: Once it is displaced, once it mediates an interaction towards the ligand as an H-bond acceptor and once as an H-bond donor. The complex structure containing an azepin derivative shows, besides the ligand interacting with catalytic aspartates, two bound fragments of this ligand in the binding pocket. This way almost the entire volume of the binding pocket is occupied which reveals interesting hints on preferred interactions. In the complex structure with the pyrrolidin derivative a disordered wide-open flap with a partly open flap pocket could be observed. This structure therefore provides insights on the flexibility of this protein family. Furthermore, ITC measurements of this complex assured a double deprotonated catalytic dyad.

Additionally, complex structures with the clinically applied HIV-protease inhibitors ritonavir and saquinavir were obtained. With respect to ritonavir also a crystal structure with the secreted aspartic proteinase 2 (SAP2) succeeded. While the binding mode of ritonavir is equivalent with the one found in the HIV-protease, saquinavir shows an unusual addressing of the catalytic dyad.

Another focus of this project is the fragment-based drug design. Benzamidine and a hydrazine derivative were used as examples to show that small low-affinity ligands can be successfully crystallized. In a second step an inhouse library containing 364 fragments was tested against Endothiapepsin. This led to 55 assay hits. Out of the 55

assay hits for eleven compounds a crystal structure was obtained. The fragments show diverse binding modes and cover almost the entire volume of the binding pocket. Furthermore, this study suggests a critical view on the “rule of three” which is frequently used in the design of fragment libraries. Especially the threshold on the maximal number of H-bond acceptors seems to be too strict.

The second project deals with the optimization of a small unspecific probe molecule into a potent inhibitor. The protein kinase A (PKA) is used as an easy to handle model system. Based on phenol, and following several design cycles an inhibitor with an affinity in the low nanomolar range could be synthesized. To achieve this, the approach of a fragment based drug design was combined with the methods of a de-novo design. This study demonstrates how experimental and computer-based methods effectively complement each other. Additionally for the first time a rather closed conformation of the glycine rich loop was observed. This provides a valuable starting point for further studies on the dynamic of this protein

In summary, the presented crystal structures provide different starting points for further drug design. In case of the pepsin-like aspartic proteinases many novel possibilities to address the catalytic dyad were revealed. Furthermore, the structure showing an open flap in endosthiapepsin as well as the one showing a rather closed glycine rich loop in PKA give a first glimpse on the dynamics of these proteins. New methodical aspects are contributed through the conduction of fragment based screenings as well as a probe-based drug design. Last but not least the diverse structures are supportive, especially in combination with computer based and further biochemical methods, to better understand the nature of protein-ligand interactions.

## 7 Material und Methoden

Soweit nicht anders angegeben wurden alle Reagenzien in der Qualität p.a. (per analysis) von Merck, Sigma Aldrich, Fluka oder Roth bezogen. Als Lösungsmittel wurde Wasser aus einer Milli-Q Anlage verwendet.

### 7.1 Proteingewinnung

#### *Endothiapepsin*

Endothiapepsin wurde aus Suparen® gewonnen. DSM Food Specialties stellte freundlicherweise eine kostenlose 100 ml Probe zur Verfügung. Suparen® wird aus dem Überstand einer *Endothia parasitica* Kultur gewonnen und in der Käseherstellung als Labersatz eingesetzt.

Ein Gel des unaufgereinigten Suparens® zeigt, dass neben Endothiapepsin keine weiteren Makromoleküle enthalten sind (Abbildung 7.1).

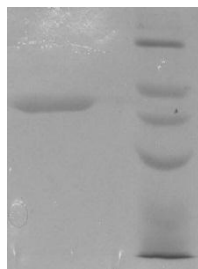


Abbildung 7.1: SDS-Gel des unaufgereinigten 1:10 verdünnten Suparens®

Aus diesem Grund genügt zur Aufreinigung die Umpufferung durch eine 10.000 Dalton Membran (Vivaspin 10.000, Abzentrifugieren mit 35000 U/min). Alle Bestandteile kleiner als 10 kDa werden auf diese Weise abgetrennt. Zielpuffer ist ein 0.1 M Acetat-Puffer pH 4.6. 1ml Suparen® wird mit Puffer auf 15 ml verdünnt und anschließend auf etwa 5 ml abzentrifugiert. Die erhaltene Lösung wird wieder mit Puffer aufgefüllt und dieser Zyklus etwa 10-mal wiederholt. Im letzten Schritt wird eine Proteinkonzentration von 5mg/ml eingestellt. Die Proteinkonzentration wird über UV Absorption bei 280 nm bestimmt wobei ein Extinktionskoeffizient von 1.15 für eine Lösung von 1 mg/ml angenommen wird.<sup>[164]</sup>

Aus 1 ml Suparen® lassen sich etwa 15 mg Endothiapepsin gewinnen.

### *PKA (Proteinkinase A, camp-abhängige Proteinkinase)*

Die katalytische Untereinheit alpha der humanen cAMP abhängigen Proteinkinase wurde im Rahmen eines Kooperationsprojekts von Merck zur Verfügung gestellt. Das Protein wurde rekombinant aus E.coli gewonnen und befindet sich nach der Aufreinigung in folgendem Puffer: 5 mM MES, 5 mM Bis-Tris-Propane/HCL, 75 mM LiCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, pH 6.9. Die Konzentration des Proteins beträgt 32 mg/ml. Ein Gel zeigt die Reinheit des Proteins.

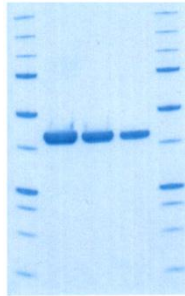


Abbildung 7.2: SDS-Gel der PKA. An den Rändern ist jeweils der Marker zu sehen, in der Mitte die Proteinprobe in drei verschiedenen Probenvolumina (von links nach rechts 30µl, 20µl, 10µl)

### *SAP2 (sekretorische Aspartylprotease 2)*

Die SAP2 wurde im Rahmen eines Kooperationsprojekts von Prof. Schirmeister aus Würzburg zur Verfügung gestellt. Das Protein wurde aus dem Überstand einer *Candida albicans* Kultur gewonnen und befindet sich nach der Aufreinigung in einem Puffer aus 20 mM BisTrisCl pH 6.0 bei einer Konzentration von 5 mg/ml. Folgendes Gel zeigt die Reinheit des Proteins.



Abbildung 7.3: SDS-Gel aus Würzburg, links sind die Banden des Markers zu sehen, rechts die Bande der SAP2.

## 7.2 Kristallisation

### Theorie

Um eine Kristallstruktur zu erhalten, wird zunächst das Protein kristallisiert. Für eine Komplexstruktur mit einem Liganden muss zusätzlich der Ligand in den Kristall eingebracht werden. Dies kann nachträglich geschehen (Soaking) oder alternativ kann der Ligand gleich mitkristallisiert werden (Kokristalle).

In dieser Arbeit erfolgt die Kristallisation in allen Fällen über Dampf-Diffusion am sitzenden Tropfen („*sitting drop*“). Der Aufbau eines typischen Experiments ist in Abbildung 7.4 schematisch dargestellt. Das Protein befindet sich im Tropfen, im Reservoir befindet sich eine Reservoirlösung. In der Regel wird eine kleine Menge der Reservoirlösung zur Proteinlösung hinzupipettiert. Im Vergleich zu der Reservoir-Lösung ist der Tropfen somit verdünnter. Tropfen und Reservoir werden luftdicht abgedeckt. Anschließend gleichen sich über Diffusion langsam die Konzentrationen aus. Die Lösung im Tropfen wird immer konzentrierter, was zum Auskristallisieren des Proteins führt. Die Kristallisation kommt nur zustande, wenn die verwendete Lösung den Prozess optimal unterstützt. Die Bedingung unter der ein Protein kristallisiert, ist für jedes Protein individuell verschieden. Die richtige Bedingung zu finden ist eine der größten Herausforderungen der Kristallographie. Sind bereits Kristalle vorhanden, kann die Kristallisation oft beschleunigt werden, indem man den Tropfen mit Kristallkeimen animpft („*streak-seeding*“). Dazu wird ein Pferdehaar durch einen Tropfen mit Kristallsplintern gezogen, kurz gewaschen (in Reservoir-Lösung) und anschließend durch den frisch angesetzten Tropfen gezogen.

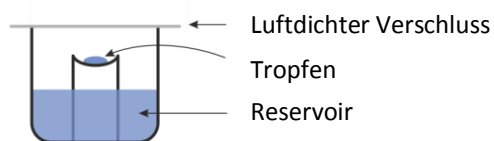


Abbildung 7.4: Schematische Darstellung eines „Sitting-Drop“ Experiments

### 7.2.1. Endothiapepsin

#### Kristallisation von ungebundenem Protein

In der Literatur finden sich drei verschiedene Kristallisationsbedingungen, die alle im Rahmen dieser Arbeit ausprobiert wurden.<sup>[44, 48, 165]</sup> Die einzelnen Bestandteile jeder Bedingung wurden kleinschrittig variiert. Alle Ansätze wurden bei 16°C durchgeführt.

1. Ammoniumsulfat-Bedingung nach der Batch-Methode (Kristallisation direkt ohne Diffusionsausgleich)<sup>[165]</sup>: 2.5 mg/ml Protein in 0.1 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 4.5 lösen. Anschließend auf pH 6.3 bringen und mit  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  sättigen. Nach Filtration und Zusatz von 0,25 – 1 % Aceton abgedeckt stehen lassen.

Ergebnis: keine Proteinkristalle

2. Ammoniumsulfat-Bedingung<sup>[44]</sup>: Proteinlösung: 2 mg/ml in 0.1 M NaAcetat Puffer pH 4.6. Reservoirlösung: 0.7 ml gesättigte  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ -Lösung + 0.7 ml 0.1 M NaAcetat Puffer pH 4.7. Tropfen: 5  $\mu\text{l}$  Proteinlösung + 5  $\mu\text{l}$  Reservoir-Lösung

Ergebnis: Proteinkristalle. Die Kristalle waren oft verwachsene, meist zweidimensionale Plättchen. Raumgruppe und Zelle waren identisch mit den Kristallen aus Bedingung 3.

3. PEG-Bedingung<sup>[48]</sup>: Proteinlösung: 5 mg/ml Protein in 0.1 M NaAcetat Puffer pH 4.5. Reservoirlösung: 32.5 % PEG 4000, 200 mM  $\text{NH}_4\text{Acetat}$ , 100 mM NaAcetat pH 4.5. Tropfen: 2  $\mu\text{l}$  Protein-Lösung + 2  $\mu\text{l}$  Reservoirlösung

Ergebnis: stäbchenförmige dreidimensionale Proteinkristalle.

Die dritte Bedingung brachte die besten Kristalle hervor. Allerdings zeigten die ersten Kristalle ein schlechtes Streuverhalten, was eine weitere Optimierung notwendig machte. Die folgende optimierte Bedingung brachte zuverlässig gut streuende Kristalle hervor. Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Endothiaepsin-Kristalle nach dieser Vorschrift kristallisiert:

Proteinlösung: 5 mg/ml Endothiaepsin in 0.1 M NaAcetat Puffer pH 4.6  
 Reservoirlösung: 1 ml 0.1 M  $\text{NH}_4\text{Ac}$ , 0.1 M Acetat Puffer pH 4.6, 26 % PEG 4000 (w/w). Die PEG Konzentration wird dabei zwischen 24 und 30 % variiert.  
 Tropfen: 2  $\mu\text{l}$  Protein-Lösung + 2  $\mu\text{l}$  Reservoir-Lösung

Für ein optimales Wachstum werden die Tropfen mit Kristallkeimen angeimpft. Kristalle erscheinen nach etwa 2 Tagen und weisen nach 1-2 Wochen eine ausreichende Größe auf. Abbildung 7.4 zeigt typische Kristalle.

Im Rahmen des in Kapitel 3.2 vorgestellten Projekts wurde zusätzlich folgende alternative Kristallisationsbedingung etabliert:

Proteinlösung: 5 mg/ml Endothiaepsin in 0.1 M NaAcetat Puffer pH 4.6  
 Reservoirlösung: 1 ml 0.2 M  $\text{NaCl}$ , 0.1 M Acetat Puffer pH 4.6, 2 M  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  Die  $\text{NH}_4\text{SO}_4$  Konzentration wird dabei zwischen 1.8 M und 2.8 M variiert.  
 Tropfen: 2  $\mu\text{l}$  Protein-Lösung + 2  $\mu\text{l}$  Reservoir-Lösung

Alternativ kann anstelle des Acetat-Puffers auch ein 0.1 M Imidazol/Malat Puffer bei pH 6.5 verwendet werden. Bei pH 6.5 kristallisiert das Protein unter diesen Bedingungen erfahrungsgemäß etwas besser. In jedem Fall werden die Tropfen für ein optimales Wachstum mit Kristallkeimen angeimpft.

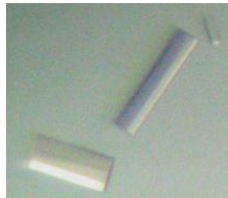


Abbildung 7.4: Endothiapepsin-Kristalle

### *Kryoschutz*

Die Datensammlung findet bei 100 K statt. Um die Bildung von Eiskristallen zu vermeiden, wird dem Puffer Glycerol beigemischt. Für Endothiapepsin-Kristalle hat sich 25 % Glycerol als Kryoschutz bewährt. In einer Lösung aus 75 % Reservoirlösung und 25 % Glycerol sind die Kristalle über mehrere Tage stabil.

### *Kokristalle*

Um Endothiapepsin zusammen mit einem Liganden zu kristallisieren, wird die Proteinlösung vor der Kristallisation mit 2 mM Ligand versetzt. Bei Einsatz einer 100 mM Ligand-Stammlösung in DMSO resultiert dies in 2 % DMSO im Tropfen. Die Kristalle wachsen besser, wenn nach Ansetzen der Tropfen zum Reservoir ebenfalls 2 % DMSO hinzugegeben wird. Beim Einfrieren der Kristalle wird der Kryolösung ebenfalls Ligand zugegeben (analog dem Soaking).

### *Soaking*

Um Liganden nachträglich in den Proteinkristall einzubringen, wird der Kristall für 1-2 Tage in einer mit Ligand versetzten Kryolösung aufbewahrt. Dazu werden 9  $\mu$ l Kryolösung (75 % Reservoirlösung, 25 % Glycerol) mit 1  $\mu$ l Ligand-Stammlösung (in 100 % DMSO) versetzt. Um ein Austrocknen zu verhindern, wird der Tropfen luftdicht abgedeckt. Bei Einsatz einer 100 mM Stammlösung resultiert eine Soaking-Konzentration von 10 mM. Um die Soaking-Konzentration zu erhöhen, kann eine konzentriertere Ligand-Stammlösung verwendet werden und/oder die DMSO-Konzentration im Tropfen auf bis zu 25 % gesteigert werden.



### *Fragment-Soaking*

Im Rahmen des Fragmentprojekts (Kapitel 3.6) wurde eine leicht modifizierte Soakingvorschrift verwendet, um die geringe Affinität sowie die Menge der zu testenden Verbindungen zu berücksichtigen. Für alle Verbindungen wird eine 1 M Stammlösung in 100 % DMSO hergestellt. Oftmals ist das Fragment unter diesen Bedingungen nicht vollständig löslich. In diesem Fall wird die entstandene Suspension ohne Abtrennen des unlöslichen Anteils verwendet. Um die Anzahl der zu bestimmenden Datensätze zu reduzieren, werden stets zwei Fragmente gleichzeitig einem Kristall zur Eindiffusion zugesetzt. Die Auswahl der Verbindungen erfolgt nach möglichst hoher chemischer und struktureller Diversität, um im Erfolgsfall den gebundenen Liganden sicher identifizieren zu können. 9 µl Kryolösung werden mit 0.5 µl jeder der beiden Fragmentlösungen versetzt, was einer finalen Konzentration von 50 mM für jedes Fragment entspricht. Die Soakingzeit beträgt 1-2 Tage. Wird ein Ligand in der Differenzelektronendichte identifiziert, wird die zweite Verbindung in einer weiteren Mischung erneut eindiffundiert. In den Fällen in denen die resultierende Differenzelektronendichte keine eindeutige Platzierung des Liganden zulässt, wird die Verbindung nochmals einzeln eindiffundiert. Es hat sich gezeigt, dass die daraus resultierende Differenzelektronendichte in der Regel besser ist als die aus den Mischungsansätzen.

### 7.2.2 PKA

Die Kristallisation der humanen PKA wurde von Merck übernommen und orientiert sich an der Kristallisation der Rinder-PKA.<sup>[153]</sup> Sie erfolgt als Sitting-Drop bei 4 °C. Der Proteinlösung wird ein PKI Bruchstück (*Proteinkinase A inhibitor fragment 5-24 amide trifluoroacetate salt*, bezogen von sigma aldrich) zugegeben. PKI ist ein kleines Protein, das an die Substrat-Erkennungsstelle bindet und dort als Inhibitor wirkt. Bei dem eingesetzten Fragment handelt es sich um die an die Bindestelle bindenden Aminosäuren. Durch die damit verbundene Fixierung des Proteins wird die Kristallisation ermöglicht.

#### *Kristallisation ungebundener PKA*

Protein-Puffer: 5mM MES, 5mM BisTris-propan, 75mM LiCl, 1mM DTT, 0,1 mM EDTA  
pH 6.9

PKI-Lösung: Es wird eine 1.5 mM Stammlösung von PKI in H<sub>2</sub>O angesetzt

MEGA-8-Lösung: MEGA-8 (N-Octanoyl-N-methylglucamine, 790 mM, bezogen von Hampton Research) wird 1:10 mit H<sub>2</sub>O verdünnt.

Proteinlösung: 25µl Protein (30mg/ml) + 14,7 µl Protein-Puffer + 4,4 µl PKI-Lösung + 0,8 µl MEGA-8-Lösung

Die Reservoirlösung der Kristallisations-Platte besteht lediglich aus einem Ethanol/H<sub>2</sub>O-Gemisch, wobei die Ethanol-Konzentration zwischen 16 und 21 % variiert wird. Der Tropfen besteht aus 1 µl Proteinlösung, wobei keine Reservoirlösung zu der Proteinlösung hinzugegeben wird. Werden die Tropfen für ein optimales Wachstum mit Kristallkeimen angeimpft, wachsen die PKA-Kristalle über Nacht.

### *Kryoschutz*

Als Kryoschutz eignet sich eine Lösung aus zwei Teilen L-(+)-2,3 Butanediol (bezogen von FLUKA), zwei Teilen Ethanol und sieben Teilen Reservoirlösung. Das anschließende Einfrieren der Kristalle in flüssigem Stickstoff erfolgt ebenfalls bei 4 °C.

### *Soaking*

Als Soaking-Lösung eignet sich eine Mischung aus 75 % Protein-Puffer und 25 % Ethanol. Zu 9 µl Soakinglösung werden 1 µl Ligandlösung (in 100 %DMSO) gegeben. Die Verweildauer der Proteinkristalle im Soaking-Tropfen beträgt üblicherweise um die 30 Minuten, kann aber bis zu 48 Stunden betragen. Wie lange die Lösung von den Kristallen vertragen wird, hängt stark von dem verwendeten Liganden ab.

### *Vernetzen mit Glutaraldehyd*

Einige Liganden werden von den Kristallen extrem schlecht vertragen. So sind im Proteinkristall oft schon nach wenigen Minuten im Soaking Tropfen deutlich sichtbare Risse vorhanden. In einigen Fällen kann ein vorheriges Quervernetzen mit Glutaraldehyd die Lebensdauer des Kristalls in den benötigten Minutenbereich verlängern. Glutaraldehyd besitzt zwei Aldehydgruppen die mit Lysin-Seitenketten an der Proteinoberfläche reagieren. Benachbarte Proteine im Kristall werden somit kovalent miteinander verbunden. Die richtige Konzentration an Glutaraldehyd ist dabei entscheidend. Zuwenig erreicht nicht den gewünschten Effekt, während eine zu starke Vernetzung die Kristallordnung stören kann.

Um PKA-Kristalle zu vernetzen wird ein Kristall in eine Soakinglösung ohne Ligand überführt. Dieser Tropfen wird mit einem Deckgläschen, an dem ein 5 µl Glutaraldehyd-Tropfen (25 %ige wässrige Lösung) hängt, abgedeckt. Über Diffusion gelangt Glutaraldehyd in den Soakingtropfen. Nach etwa einer Stunde ist der Kristall ausreichend quervernetzt und wird in einen frischen Soaking-Tropfen mit Ligand überführt. Für ein optimales Ergebnis ist es oft erforderlich, die Soaking- wie auch die Vernetzungszeit für jeden einzelnen Liganden zu optimieren. Die verwendeten Zeiten

der bestimmten Komplexe finden sich bei den jeweiligen Strukturbeschreibungen (Kapitel 5.1).

### *Kokristalle*

Um das Protein zusammen mit einem Inhibitor zu kristallisieren, werden jeweils 8  $\mu$ l der Proteinlösung mit 0.3  $\mu$ l Inhibitor-Lösung (in 100 % DMSO) versetzt. Der Rest erfolgt analog der Kristallisation für ungebundenes Protein. Meist ist ein erneutes Animpfen der Tropfen mit Kristallkeimen nach 1-2 Tagen notwendig. Beim Einfrieren wird der Kryolösung ebenfalls Ligand zugegeben (analog dem Soaking).

### 7.2.3 SAP2

In der Literatur finden sich verschiedene Bedingungen unter denen SAP2 Kokristalle kristallisiert wurden. Abad-Zapatero et al. gelang es das Protein in drei verschiedenen Raumgruppen zu kristallisieren. ( $P_1$ ,  $P_2_12_12_1$  und  $P_2_1$ )<sup>[119]</sup>. Cutfield et al. kristallisierten einen Kokristall in  $P_4_32_12_2$ , allerdings ohne die Bedingungen anzugeben, und einen Pepstatin-Komplex in  $P_2_12_12_1$  (nicht in der PDB hinterlegt).<sup>[120]</sup> Die drei in der Literatur angegebenen Bedingungen sind:

1. Proteinlösung: 5-10 mg/ml in 25 mM Glycine, 25 mM NaCl pH 4.5. Reservoirlösung: 40 mM NaCacodylat Puffer pH 6.5, 5-10 mM ZnAcetat, 22 % PEG8000 ( $P_1$ , Abad-Zapatero)
2. Proteinlösung wie bei Bedingung 1. Reservoirlösung: 40 mM Imidazol/Malat-Puffer pH 6.5, 1 bzw. 5 mM ZnAcetat, 22-24 % PEG8000 ( $P_2_12_12_1$  (1 mM ZnAcetat) und  $P_2_1$  (5 mM ZnAcetat), Abad-Zapatero)
3. Proteinlösung: keine Angaben, Reservoirlösung: 0.1 M NaCacodylat pH 6.5, 0.1 M ZnAcetat, 16% PEG 8000. ( $P_2_12_12_1$ , Cutfield)

Es fällt auf, dass alle drei Bedingungen sehr ähnlich zueinander sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Vielzahl an Variationen ausprobiert. Es wurden lediglich Kristalle der Raumgruppe  $P_2_12_12_1$  erhalten. Alle ungebundenen Kristalle wurden bei 16 °C als *Sitting-Drop* mit folgender optimierter Bedingung kristallisiert:

Proteinlösung: 5 mg/ml in 20 mM BisTrisCl pH 6.0.

Reservoirlösung: 0.1 M Imidazol/Malat Puffer pH 6.5, 9 mM ZnAcetat, 16 % PEG8000.

Tropfen: 2  $\mu$ l Proteinlösung + 3  $\mu$ l Reservoirlösung

Werden die Tropfen nach dem Ansetzen mit Kristallkeimen angeimpft, wachsen nach 1-2 Tagen Kristalle. Eine spontane Kristallisation gelingt nur selten.

Anstelle des Imidazol/Malat Puffers bei pH 6.5 kann auch ein NaAcetat Puffer bei pH 4.6 (oder sogar pH 3.2) verwendet werden. Obwohl die Kristallisation bei pH 6.5 in der Regel besser gelingt, kann die Verwendung des Acetat Puffers von Vorteil sein, da das Protein im Sauren aktiv ist.

#### *Kryoschutz*

Eine Mischung aus 40% MPD und 60% Reservoirlösung hat sich als Kryolösung bewährt.

#### *Soaking*

Als Soakinglösung eignen sich 9  $\mu$ l Kryolösung versetzt mit 1  $\mu$ l Ligand-Stammlösung (in 100% DMSO). Die Soakingzeit beträgt in der Regel 24 Stunden.

#### *Kokristalle*

Der Proteinlösung wird vor dem Ansetzen der Tropfen 1% Ligand-Lösung in DMSO hinzugegeben. Das Reservoir wird anschließend ebenfalls um 1 % DMSO ergänzt. Beim Einfrieren der Kristalle wird der Kryolösung ebenfalls Ligand zugegeben (analog dem Soaking).

### 7.3 Datensammlung, Strukturlösung und Verfeinerung

#### *Theorie*

Ein Proteinkristall ist aus einer Vielzahl symmetrisch angeordneter Proteinmoleküle aufgebaut. Röntgenstrahlen werden an den einzelnen Atomen der Proteine gebeugt, wobei die entstehenden Wellen miteinander interferieren. Da diese Interferenz lediglich in bestimmten Winkeln konstruktiv ist und somit zum Streubild beiträgt, entsteht dadurch das typische aus separierten Punkten bestehende Streumuster.

Das Streubild eines Proteinkristalls wird mit Hilfe eines Röntgendiffraktometers aufgenommen. Um Reflexe aus verschiedenen Orientierungen aufzunehmen wird der Kristall im Röntgenstrahl gedreht, wobei der typische Drehbereich pro Bild 0.5° umfasst.

Während der anschließenden Datenprozessierung werden die einzelnen Reflexe zugeordnet (indiziert) und dabei die Orientierung des Kristalls, die Größe der

Einheitszelle sowie die Raumgruppe bestimmt. Zur Bestimmung der Intensität der einzelnen Reflexe wird über die Fläche um diese integriert. Anschließend werden die Reflexe skaliert und die Intensität mehrfach erfasster sowie symmetrieäquivalenter Reflexe gemittelt. Ein wichtiges Qualitätsmerkmal für den gesammelten Datensatz ist der  $R_{\text{sym}}$ . Er gibt an inwieweit die symmetrieäquivalenten Reflexe in ihrer Intensität übereinstimmen.

Der nächste Schritt ist die Strukturlösung. Bei der Datensammlung werden lediglich die Intensitäten der Reflexe ermittelt, nicht aber ihre Phasen. Um per Fourier-Synthese aus den Reflexen die dreidimensionale Struktur des Kristalls zurück zu rechnen ist die Phase allerdings zwingend notwendig. Dieses Problem ist auch als das Phasenproblem in der Kristallographie bekannt. Es gibt mehrere experimentelle Methoden die Phasen zu bestimmen auf die hier nicht weiter eingegangen werden soll. Ist schon eine Struktur des Proteins bekannt, kann die Struktur über den molekularen Ersatz bestimmt werden. Dazu werden die Phasen aus einem Modell berechnet und räumlich in Übereinstimmung mit den gemessenen Daten gebracht. Mit diesen Phasen und den gemessenen Intensitäten werden Strukturfaktoren und daraus die erste Dichte berechnet.

Als Verfeinerung wird das Anpassen des Modells an die gemessenen Daten bezeichnet. Eine besondere Bedeutung hat hierbei die Differenzdichte  $mF_o - DF_c$ .  $F_o$  steht für die beobachteten Strukturfaktoren (also aus den experimentellen Daten),  $F_c$  steht für die aus dem Modell berechneten Strukturfaktoren.  $m$  und  $D$  sind Gewichtungsfaktoren. Eine Dichte, die sich aus der Differenz dieser beiden Strukturfaktoren ergibt, zeigt somit die Unterschiede zwischen dem Modell und den tatsächlichen Daten auf. Neben der Differenzelektronendichte wird in der Regel auch die oder  $2mF_o - DF_c$  (oder  $3F_o - 2F_c$ ) Dichte betrachtet. Diese Dichte gibt die gesamte Dichte (also auch die der bereits im Modell berücksichtigten Atome) wieder. Während der Verfeinerung wird das Modell solange angepasst, bis es möglichst exakt mit den experimentellen Daten übereinstimmt.

Durch jeden Verfeinerungsschritt wird das Modell verbessert woraus sich anschließend genauere Phasen berechnen lassen. Dadurch verbessert sich wiederum die Dichte, was die Verfeinerung zu einem iterativen Prozess macht.

Zur Beurteilung der Qualität der Verfeinerung wird der R-Wert verwendet. Neben dem R-Wert ( $R_{\text{work}}$ ) ist vor allem der freie R-Wert ( $R_{\text{free}}$ ) von Bedeutung. Vor Beginn der Verfeinerung werden meist 5 % aller Reflexe zufällig ausgewählt und von der Verfeinerung ausgeschlossen. Der freie R-Wert berechnet sich lediglich aus diesen Reflexen. Verbessert sich während der Verfeinerung der R-Wert nicht aber der freie R-Wert, ist dies ein Zeichen für eine Überanpassung des Modells.

$$R = \frac{\sum ||F_o| - k|F_c||}{\sum |F_o|}$$

Gleichung 7.1 Kristallographischer R Wert.  $|F_o|$  sind die gemessenen Amplituden,  $|F_c|$  die aus dem Modell berechneten Amplituden,  $k$  ein Skalierungsfaktor.

Neben den Koordinaten ist der B-Wert ein weiterer wichtiger Parameter der, je nach Auflösung, für jedes Atom oder Atomgruppen verfeinert wird. Der B-Wert wird auch Temperaturfaktor genannt und gibt an in wie weit die Position des Atoms in den Einheitszellen variiert und wie stark das Atom schwingt. Der B-Wert kann isotrop oder anisotrop verfeinert werden. Bei der isotropen Verfeinerung wird die Schwingung des Atoms lediglich als Kugel betrachtet, bei der anisotropen Verfeinerung hingegen wird eine Ellipse angenommen. Eine Ellipse kann das unterschiedliche Schwingungsverhalten in die verschiedenen Raumrichtungen besser abbilden, benötigt aber mehr Parameter. Somit eignet sich die anisotrope Verfeinerung lediglich für Strukturen mit einer hohen Auflösung, welche ein gutes Daten-zu-Parameter-Verhältnis gewährleisten.

### *Experimenteller Teil*

Zur Datensammlung standen im Laufe dieser Arbeit mehrere Röntgenquellen zur Verfügung. Neben einem hauseigenen Gerät bestand die Möglichkeit Messzeit an dem Synchrotron in Berlin (BESSY) und der Schweiz (SLS) in Anspruch zu nehmen.

Das hauseigene Röntgendiffraktometer ist mit einer feststehenden Kupfer Mikrofokus-Röntgenröhre und einem MAR345 Image Plate Detektor ausgestattet. In Berlin an der Beamline 14.2 steht ein Rayonix MX-255 CCD Detektor. Beamline 14.3 ist mit einem Rayonix SX-165 CCD Detektor ausgestattet. Am SLS (Beamline XD06A) findet sich ein Marmosaic 225 CCD Detektor.

Alle Datensätze wurden bei 100 K gesammelt und mit HKL2000 prozessiert und skaliert.<sup>[166]</sup>

Die initiale Strukturlösung wurde über den molekularen Ersatz (molecular replacement) mit dem Programm Phaser des ccp4i Pakets durchgeführt.<sup>[167]</sup> Als Suchmodell für Endothiapepsin wurde eine 0.90 Å Struktur von Endothiapepsin im Komplex mit einem Dipeptid verwendet (PDB Code: 1OEW)<sup>[39]</sup>. Für die SAP2 wurde ebenfalls eine Komplexstruktur aus der PDB verwendet (PDB Code: 1EAG)<sup>[120]</sup>. Für PKA Strukturen wurde als Suchmodell eine von Merck zur Verfügung gestellte Komplexstruktur verwendet. In allen Modellen wurden lediglich die Proteinatome berücksichtigt. Für die meisten Folge-Strukturen war zur Strukturlösung ein rigid-body-refinement mit einer ähnlichen Struktur ausreichend (durchgeführt mit CNS).<sup>[168]</sup>

Anschließend wurde ein simulated annealing sowie eine initiale Verfeinerung der B-Werte mit CNS durchgeführt. Für die Berechnung des  $R_{\text{free}}$  wurden aus jedem Datensatz 5 % der Reflexe zufällig ausgewählt und aus der Verfeinerung ausgeschlossen.

Die weiteren Verfeinerungs-Zyklen wurden mit SHELXL oder PHENIX durchgeführt.<sup>[100, 169]</sup> Nach jeder Verfeinerung wurden die Modelle visuell mit COOT inspiziert und anhand der  $mF_o-DF_c$  sowie der  $2mF_o-DF_c$  Dichten verbessert.<sup>[101]</sup> Neben einem Optimieren der Aminosäure-Seitenketten wurden Wasser und Liganden nach und nach in die Verfeinerung mit aufgenommen. Geometrische Randbedingungen (engl.: restraints) um die Liganden in die Dichte einzupassen wurden mit dem *monomer library sketcher* des Programmpakets ccp4i,<sup>[170]</sup> elBOW in Phenix<sup>[100]</sup> oder dem PRODRG Server<sup>[171]</sup> erstellt. Je nachdem, welches Programm für die Verfeinerung gewählt wurde, wurden die verwendeten Randbedingungen für den Liganden während der Verfeinerung mit elBOW oder Shelxpro erzeugt. Einige Strukturen mit besonders guter Auflösung wurden in ihren letzten Zyklen zusätzlich anisotrop verfeinert. Dabei wurde die anisotrope Verfeinerung nur in den Fällen beibehalten wo sich dadurch eine signifikante Verbesserung der Dichte oder der R-Werte ergeben hat.

Details zu jeder einzelnen Struktur finden sich in den kristallographischen Tabellen.

Die Bilder der Strukturen die in dieser Arbeit gezeigt werden, wurden alle mit dem Programm PyMOL (Version 0.99) erzeugt.<sup>[38]</sup>

## 7.4 Affinitätsbestimmungen

### 7.4.1 Fluoreszenzbasierter Assay für Endothiapepsin

#### Theorie

Der fluoreszenzbasierte Assay ist ein einfacher kompetitiver Assay zur Affinitätsbestimmung verschiedener Liganden. Bei diesem Assay konkurriert der zu vermessende Ligand mit einem Substrat um die Bindetasche des Proteins. Das eingesetzte Substrat enthält einen Fluoreszenz-Donor und einen Fluoreszenz-Akzeptor. Wird das System angeregt, wird die vom Donor emittierte Fluoreszenz vom Akzeptor absorbiert. Diesen Vorgang nennt man *Fluoreszenz-Quenching*. Wird das Substrat gespalten, und somit die Donor- von der Akzeptorgruppe getrennt, findet kein *Quenching* mehr statt. Somit kann die Fluoreszenz beobachtet werden. Im Verhältnis zum Protein wird ein großer Substratüberschuss eingesetzt, welcher nach und nach gespalten wird. Dies führt zu einem kontinuierlichen Anstieg des Fluoreszenzsignals bis das Substrat verbraucht ist. Bei Zusatz eines Inhibitors wird die Substratspaltung

verhindert. Somit wird in diesem Fall eine verminderte bzw. keine Fluoreszenzsteigerung beobachtet. Der  $IC_{50}$  gibt an, bei welcher Inhibitorkonzentration 50 % des Proteins gehemmt wird (also die Fluoreszenzsteigerung um 50 % vermindert ist) und ist somit ein Maß für die Affinität des Inhibitors. Um den  $IC_{50}$  zu bestimmen werden verschiedene Inhibitorkonzentrationen vermessen. Der Logarithmus dieser Konzentrationen wird gegen die beobachtete initiale Fluoreszenzsteigerung aufgetragen. Es ergibt sich dabei die typische sigmoidale Kurve. Der Wendepunkt dieser Kurve gibt den  $IC_{50}$  an (Abbildung 6.5).

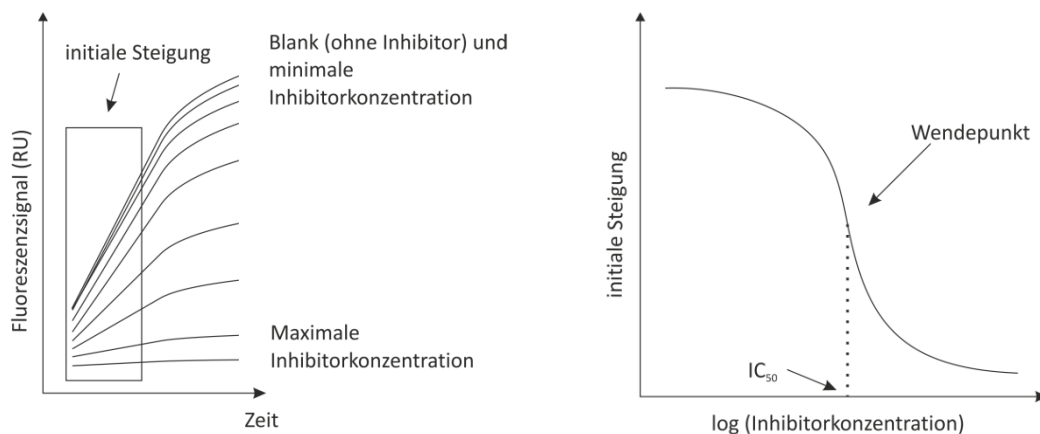


Abbildung 7.5:  $IC_{50}$  Bestimmung. Die initiale Steigung des Fluoreszenzsignals wird gegen den Logarithmus der Inhibitorkonzentration aufgetragen. Der Wendepunkt der sigmoidalen Kurve gibt den  $IC_{50}$  an.

Der Inhibitor steht bei diesem Assay in Konkurrenz zu dem Substrat. Somit beeinflusst die Affinität des Substrats die zu bestimmende Affinität des Inhibitors. Der  $K_i$  ist die um diesen Effekt bereinigte Affinität und berechnet sich nach der Formel von Cheng und Prusoff.<sup>[172]</sup>

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

Formel 7.1: Cheng-Prusoff Gleichung:  $K_i$  ist dabei die Inhibitionskonstante,  $IC_{50}$  die mittlere inhibitorische Konzentration des Liganden,  $[S]$  die eingesetzte Substratkonzentration und  $K_m$  die Michaelis-Menten Konstante des Substrats

Der  $K_m$  ist dabei die Michaelis-Menten-Konstante des Substrats und ein Maß für die Affinität des Substrats gegenüber dem Enzym. Um den  $K_m$  zu bestimmen, wird die Umsatzgeschwindigkeit (initiale Steigung) bei verschiedenen Substratkonzentrationen



vermessen. Der  $K_m$  beschreibt die Substratkonzentration, bei der die halbe maximale Umsatzgeschwindigkeit erreicht wird.

Um den  $IC_{50}$  (bzw.  $K_i$ ) eines Liganden zu bestimmen, ist eine Verdünnungsreihe mit meist wenigstens 10 verschiedenen Verdünnungen notwendig. In dieser Arbeit wurde oftmals nur die prozentuale Inhibition bei einer Konzentration bestimmt (d.h. die initiale Steigung mit und ohne Inhibitor verglichen). Dieser Wert liefert einen ersten Anhaltspunkt für die Affinität einer Verbindung. Aufgrund des deutlich geringeren Arbeitsaufwandes ist dies vor allem bei einem ersten Durchmustern größerer Serien vorteilhaft.

### *Experimenteller Teil*

Als Substrat wurde Abz-Thr-Ile-Nle-p-nitro-Phe-Gln-Arg-NH<sub>2</sub> (gekauft von Bachem) eingesetzt. Dieses Substrat wurde ursprünglich für die HIV-Protease synthetisiert <sup>[173]</sup>, wird aber auch von Endothiapepsin gespalten. Die Spaltstelle liegt zwischen Norleucin und p-Nitro-Phenylalanin. Abz (2-Aminobenzoyl) dient als Fluoreszenz-Donor, p-Nitro-Phenylalanin als Akzeptor. Gegen Endothiapepsin beträgt der  $K_m$  des Substrats 1.6  $\mu$ M. Dieser Wert stellt den Mittelwert aus drei Bestimmungen mit einer Standardabweichung von 0.4  $\mu$ M dar.

Der Assay wurde an einem Tecan Safire<sup>2</sup> *microplate reader* durchgeführt. Unbeschichtete schwarze 96-well Assayplatten wurden von Nunc bezogen. Während der Messung wurde bei 337 nm angeregt und bei 414 nm ausgelesen. Die Bandbreite des Filters betrug jeweils 10 nm. Für einen Messwert wurde über 2 ms integriert. Insgesamt wurden pro well meist 30 Messwerte in einem Abstand von 20 s aufgenommen.

Der Assay-Puffer (0.1 M Na-Acetat pH 4.6 mit 0,01 % Tween20) wurde vor der Messung mit dem Substrat und dem zu vermessenden Liganden vermischt. Das Protein wurde erst kurz vor der Messung hinzupipettiert. Die Endkonzentrationen des Proteins und des Substrats betrugen 4 nM beziehungsweise 1.8  $\mu$ M. Für die Kontrollen wurde anstelle des Liganden (in DMSO) pures DMSO verwendet. In der Regel wurde mit einer DMSO Konzentration von 1 % gearbeitet.

Die Bestimmung der initialen Steigung wurde mit Excel durchgeführt. Dazu wurde eine Ausgleichsgerade durch den ersten linear verlaufenden Kurventeil gelegt. Zur weiteren Auswertung wurde das Programm GraFit verwendet. Es wurden meist zwei Messungen durchgeführt und deren Ergebnis gemittelt.

#### 7.4.2 SPR Messungen an PKA

##### Theorie:

Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (im folgenden SPR abgekürzt) ist eine Methode, die eine direkte Beobachtung der Ligand-Protein-Interaktion erlaubt. Dabei wird das Protein kovalent an eine Goldoberfläche gebunden und eine Ligand-Lösung vorbeigeleitet. Die Bindung des Liganden an das Protein kann dabei über eine Änderung der Oberflächenplasmonenresonanz beobachtet werden.

Oberflächenplasmonen sind elektromagnetische Oberflächenwellen (so genannte evaneszente Wellen), welche durch die Oszillation freier Elektronen in einem Metall zustande kommen. Sie breiten sich parallel zu einer Metalloberfläche aus und können unter bestimmten Bedingungen mit Licht angeregt werden. Da die Oberflächenplasmonen sich direkt an der Grenze des Metalls zu seiner Umgebung befinden, reagieren sie sehr empfindlich auf eine Änderung dieser Grenzfläche. So ändert sich die Wellenlänge der Oberflächenplasmonen abhängig von der Änderung der Brechungszahl in der unmittelbaren Nähe der Metalloberfläche. Eine solche Änderung der Brechungszahl kann durch die Bindung eines Liganden an das kovalent an die Goldoberfläche gebundene Protein erreicht werden.

Der schematische Versuchsaufbau eines SPR-Geräts ist in Abbildung 7.6 dargestellt. Um die Oberflächenplasmonen anzuregen, wird monochromatisches, parallel polarisiertes Licht durch ein Prisma auf die Goldoberfläche gestrahlt wobei eine Totalreflexion eintritt. Im richtigen Winkel ist der elektromagnetische Anteil des Lichts in der Lage die Oberflächenplasmonen anzuregen wodurch ein Teil der Energie absorbiert wird (SPR-Winkel). Die Intensität des reflektierten Lichts wird winkelabhängig detektiert. Die Position des SPR-Winkels wird dabei durch eine Intensitätsminderung gekennzeichnet (*SPR-Dip*). Durch eine Änderung der Brechungszahl, ändert sich die Wellenlänge der Oberflächenplasmonen, wodurch sich der Winkel bei dem sie angeregt werden können ebenfalls ändert. Somit gibt die Verschiebung des SPR-Winkels Aufschluss über einen veränderten Brechungsindex, der wiederum von den an die Goldoberfläche gebundenen Molekülen abhängt. Die Verschiebung des SPR-Winkels wird als RU ausgegeben und ist prinzipiell proportional zur der an die Goldoberfläche gebundenen Masse.

Der Verlauf eines typischen Sensogramms ist in Abbildung 7.6 oben rechts gezeigt. Zuerst wird lediglich Lösungsmittel über die Oberfläche gespült (Basislinie). Wird der Ligand injiziert, gibt die ansteigende Kurve die Assoziation des Liganden an das Protein wieder. Es stellt sich ein Plateau („*steady state*“) ein bei dem sich Dissoziation und Assoziation ausgleichen. Ist die Injektion beendet, dissoziiert der Ligand wieder ab. Nach einer Weile wird eine Regenerationslösung verwendet um den Liganden

vollständig zu entfernen und somit die Oberfläche für den nächsten Zyklus vorzubereiten.

Über die anfängliche Steigung lässt sich die Assoziationskonstante  $k_{on}$  und über den Abfall nach Ende der Injektions die Dissoziationskonstante  $k_{off}$  bestimmen. Die Affinität  $K_D$  lässt sich einerseits über die Kinetik, also  $k_{on}$  und  $k_{off}$ , bestimmen oder über eine Auswertung des *Steady-state* einer Verdünnungsreihe.

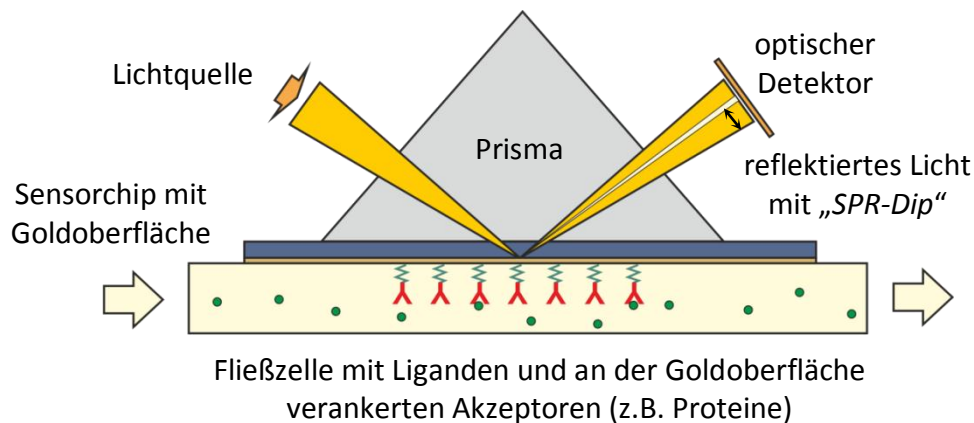


Abbildung 7.7: Schematischer Aufbau eines SPR-Experiments.

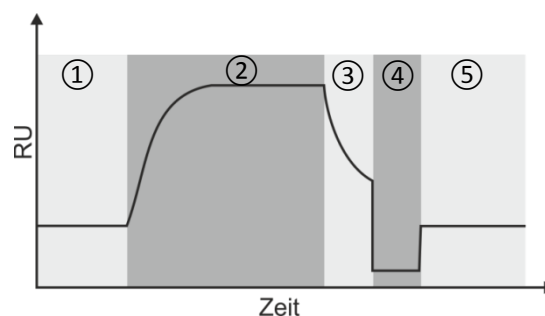


Abbildung 7.8: Beispiel eines typischen Sensogramms. Im Folgenden ist in Klammern die zum jeweiligen Zeitpunkt eingespritzte Lösung angegeben. ①: Basislinie (Fließmittel) ②: Assoziation und anschließendes „Steady-state“ (Fließmittel mit Ligand) ③: Dissoziation (Fließmittel) ④: Regeneration (Regenerationsmittel) ⑤: Basislinie (Fließmittel).

#### Experimenteller Teil:

Die SPR Messungen wurden mit einem Gerät der Firma Biacore, meist ein Biacore S51, bei der Firma Merck durchgeführt. Das Protein wurde mittels einer Aminkupplung auf der Oberfläche eines CM5-Sensorchips immobilisiert. Dazu wurde die Dextran-Oberfläche zunächst mit NHS (N-Hydroxysuccinimid) und EDC (1-Ethyl-3-(3dimethylaminopropyl)carbodiimid) aktiviert. Die dadurch entstehenden reaktiven Succinid-Ester sind in der Lage mit primären Aminen spontan zu reagieren. Während der Immobilisation wurde ein Laufpuffer, bestehend aus HBS-N Puffer (0.15 M NaCl

und 20 mM HEPES) mit 0.05 % Tween20 sowie 200  $\mu$ M  $\text{MgCl}_2$ , eingestellt auf pH 6.8, verwendet. Die eingesetzte Proteinlösung beinhaltete 20  $\mu$ g/ml PKA (bzw 10  $\mu$ g/ml) in einem Puffer aus 10 mM BisTris pH 6.5, 200  $\mu$ M ATP sowie 2 mM  $\text{MgCl}_2$ . Der Zusatz von ATP ist notwendig, um die ATP-Bindetasche zu besetzen damit eine Vernetzung über das in der Bindetasche befindliche Lysin verhindert wird. Magnesium wird eingesetzt um eine ausreichende Affinität des ATP zur PKA zu gewährleisten. Die typische Flussrate während der Immobilisierung betrug 10  $\mu$ l/min für 7 Minuten. Es wurden zwei Immobilisierungen durchgeführt: eine mit einer hohen Proteinkonzentration sowie eine mit einer niedrigeren. Nach der Immobilisierung wurden die restlichen reaktiven Succimid-Ester der Oberfläche mit Ethanolamin abgesättigt.

Während der Messung wurde ein Laufpuffer bestehend aus HBS N Puffer (0.15 M NaCl und 20 mM HEPES), 0.05% Tween20, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , eingestellt auf pH 6.8, verwendet. Zusätzlich wurde DMSO in der Menge wie für die Ligand-Lösungen eingesetzt zugegeben. Die Regeneration erfolgte mittels einer 100 mM  $\text{NaHCO}_3$  Lösung bei pH 8.6. Die DMSO Konzentration der Ligand-Lösungen (und entsprechend des Laufpuffers) betrug 2 %, wobei eine Lösungsmittelkorrektur im Bereich von 1.2 – 2.8 % DMSO durchgeführt wurde. Die Flussrate während der Messung betrug 30  $\mu$ l/min. Als Positivkontrolle wurde der hochaffine Ligand H-89 in einer Konzentration von 1  $\mu$ M verwendet (beziehbar von Sigma Aldrich). Die zu analysierenden Verbindungen wurden in Verdünnungsreihen mit je 10 Konzentrationsstufen vermessen.

#### 7.4.3 ITC Messungen an Endothiapepsin

##### *Theorie*

Mit Hilfe der Isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) kann das thermodynamische Profil der Ligandbindung bestimmt werden. Neben der Affinität ( $K_d$ ) wird auch die Enthalpie ( $\Delta H$ ), die Entropie ( $\Delta S$ ) sowie die Bindungsstöchiometrie ( $n$ ) erhalten. Die Affinität kann somit in einen enthalpischen und entropischen Beitrag aufgeschlüsselt werden. Abbildung 7.9 zeigt schematisch den prinzipiellen Aufbau eines ITC Geräts. Das Gerät enthält zwei Zellen: eine Referenzzelle, die in der Regel mit destilliertem Wasser gefüllt ist, und eine Probenzelle. In der Probenzelle befindet sich das Protein gelöst in einem wässrigen Puffer. In die Probenzelle ragt eine Spritze mit Rührer. Die Spritze enthält den Liganden gelöst im selben Puffer wie das Protein. Probe und Referenzzelle werden von dem Gerät sehr genau auf der gleichen Temperatur gehalten. Während der Messung wird nach und nach der Ligand in die Probenzelle eingetropft. Durch die Bindung des Liganden an das Protein entsteht Bindungswärme (exotherm) oder wird verbraucht (endotherm). Das Gerät registriert die Energiemenge, die aufgebracht werden muss, um in Proben und Referenz-Zelle wieder die gleiche Temperatur zu erreichen.

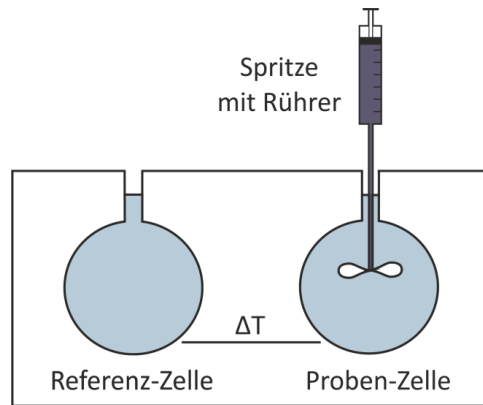


Abbildung 7.9: Schematischer Aufbau eines ITC Geräts.

Der obere Teil von Abbildung 7.10 zeigt die aus einer Messung erhaltenen Rohdaten. Jedes Signal („Peak“) entspricht einer Einspritzung von Ligandlösung. Am Anfang können alle eingespritzten Ligandmoleküle mit dem Protein interagieren, d.h. die maximale Wärmemenge wird freigesetzt. Mit der Zeit sind immer mehr Proteinstellen abgesättigt, die Signale werden schwächer. Sind alle Proteinstellen besetzt (es kann also keine Bindung mehr stattfinden bzw. in einem dynamischen Gleichgewicht tritt keine Nettoänderung mehr auf) sind meist trotzdem noch kleine Signale zu erkennen. Der Grund dafür ist die Verdünnungswärme, die beim Vermischen zweier ungleicher Lösungen zustande kommt. Um diese Signale möglichst gering zu halten, ist es wichtig das Ligand und Protein-Puffer so identisch wie möglich sind (insbesondere in Bezug auf die DMSO-Konzentration).

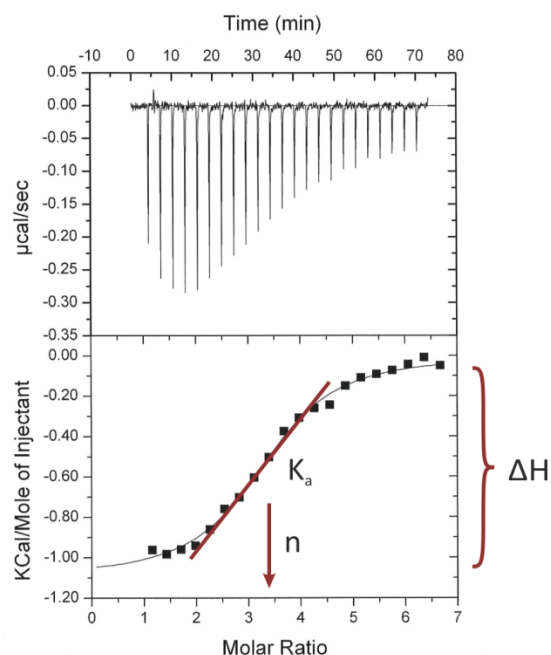


Abbildung 7.10: Bestimmung der thermodynamischen Parameter anhand der mittels ITC erhaltenen Daten

Zur Auswertung werden die einzelnen Signale integriert (Abbildung 7.10 unten). Für jede Injektion wird so die freigesetzte Wärmemenge bestimmt. Dieser Wert wird gegen das molare Verhältnis von hinzu pipettiertem Ligand und eingesetztem Protein aufgetragen. Das molare Verhältnis errechnet sich aus den eingesetzten Konzentrationen an Ligand und Protein sowie dem Injektionsvolumen. Es ergibt sich eine sigmoidale Kurve. Der Abstand der beiden Plateaus entspricht  $\Delta H$ , aus der Steigung der Kurve ergibt sich  $K_a$  ( $1/K_a = K_d$ ) und die Stöchiometrie der Reaktion lässt sich aus der molaren Relation am Wendepunkt der Kurve ablesen. Aus diesen direkt bestimmten Werten lässt sich die Entropie mit Hilfe der folgenden Formeln errechnen:

$$\Delta G = -RT \ln(K_a)$$

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

Formel 7.3: Formeln für die Gibbs-energie ( $\Delta G$ ) zur Berechnung des Entropieanteils ( $\Delta S$ . R ist die Gaskonstante, T die Temperatur in Kelvin.)

Mit Hilfe der ersten Formel lässt sich  $\Delta G$  aus der Affinität berechnen. Durch Umstellen der zweiten Formel erhält man mit Hilfe der Enthalpie ( $\Delta H$ ) und  $\Delta G$  die Entropie ( $\Delta S$ ).

### *Experimenteller Teil*

Um Aufschluss über den Protonierungszustand der katalytischen Diade von Endothiapepsin bei Bindung eines Pyrrolidinderivats zu erhalten, wurden ITC Messungen in verschiedenen Puffersystemen durchgeführt (siehe Kapitel 3.3). In allen Fällen wurde Endothiapepsin vor der Messung in den gewünschten Puffer umdialysiert. Die Proteinkonzentration wurde vor dem Verdünnen und Dialysieren über UV-Absorption bestimmt und unterliegt somit einer gewissen Ungenauigkeit. Als Ligand wurde in allen Fällen ST47 verwendet. Zu Beginn wurde von diesem Liganden eine 100 mM Stammlösung in DMSO hergestellt. Die ITC Messungen wurden an einem ITC<sub>200</sub> Gerät der Firma MicroCal durchgeführt. Im Folgenden sind die experimentellen Bedingungen in jedem Puffersystem aufgeführt.

0.1 M Acetat-Puffer bei pH 4.7 mit 2.5 % DMSO: Die Proteinkonzentration betrug 35  $\mu$ M, die Ligandkonzentration 1.25 mM. Es wurden zwei Messungen mit einem Injektionsvolumen von 1.5  $\mu$ l und eine Messung mit einem Injektionsvolumen von 2  $\mu$ l durchgeführt.

0.01 M Oxalsäure-Puffer bei pH 4.7 mit 2.5 % DMSO: Die Proteinkonzentration betrug 17.5  $\mu$ M, die Ligandkonzentration 0.625  $\mu$ M. Das Injektionsvolumen umfasste bei allen drei Messungen 1.5  $\mu$ l.

0.1 M Succinylsäure-Puffer bei pH 4.7 mit 2.5 % DMSO: Die Proteinkonzentration betrug 35  $\mu\text{M}$ , die Ligandkonzentration 1.25 mM. Als Injektionsvolumen wurden bei allen drei Messungen 1.5  $\mu\text{l}$  gewählt.

## 8 Literaturverzeichnis

1. Fleming, A., *On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae*. 1929. Bull World Health Organ, 2001. **79**(8): p. 780-90.
2. Gershell, L.J. and J.H. Atkins, *A brief history of novel drug discovery technologies*. Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(4): p. 321-7.
3. Andricopulo, A.D., L.B. Salum, and D.J. Abraham, *Structure-based drug design strategies in medicinal chemistry*. Curr Top Med Chem, 2009. **9**(9): p. 771-90.
4. Agarwal, A.K. and C.W. Fishwick, *Structure-based design of anti-infectives*. Ann N Y Acad Sci, 2010. **1213**: p. 20-45.
5. Cohen, N.C., *Structure-based drug design and the discovery of aliskiren (Tekturna): perseverance and creativity to overcome a R&D pipeline challenge*. Chem Biol Drug Des, 2007. **70**(6): p. 557-65.
6. Rowland, R.S., *Using X-ray crystallography in drug discovery*. Curr Opin Drug Discov Devel, 2002. **5**(4): p. 613-9.
7. Klebe, G., *Recent developments in structure-based drug design*. J Mol Med (Berl), 2000. **78**(5): p. 269-81.
8. Anderson, A.C., *The process of structure-based drug design*. Chem Biol, 2003. **10**(9): p. 787-97.
9. Blum, A., J. Bottcher, S. Dorr, A. Heine, G. Klebe, and W.E. Diederich, *Two solutions for the same problem: multiple binding modes of pyrrolidine-based HIV-1 protease inhibitors*. J Mol Biol, 2011. **410**(4): p. 745-55.
10. Steuber, H., M. Zentgraf, C. Gerlach, C.A. Sotriffer, A. Heine, and G. Klebe, *Expect the unexpected or caveat for drug designers: multiple structure determinations using aldose reductase crystals treated under varying soaking and co-crystallisation conditions*. J Mol Biol, 2006. **363**(1): p. 174-87.
11. Berman, H.M., J. Westbrook, Z. Feng, G. Gilliland, T.N. Bhat, H. Weissig, I.N. Shindyalov, and P.E. Bourne, *The Protein Data Bank*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(1): p. 235-42.
12. Lipinski, C.A., F. Lombardo, B.W. Dominy, and P.J. Feeney, *Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings*. Adv Drug Deliv Rev, 2001. **46**(1-3): p. 3-26.
13. Congreve, M., R. Carr, C. Murray, and H. Jhoti, *A 'rule of three' for fragment-based lead discovery?* Drug Discov Today, 2003. **8**(19): p. 876-7.
14. Makara, G.M., *On sampling of fragment space*. J Med Chem, 2007. **50**(14): p. 3214-21.
15. Hann, M.M., A.R. Leach, and G. Harper, *Molecular complexity and its impact on the probability of finding leads for drug discovery*. J Chem Inf Comput Sci, 2001. **41**(3): p. 856-64.
16. Abad-Zapatero, C. and J.T. Metz, *Ligand efficiency indices as guideposts for drug discovery*. Drug Discov Today, 2005. **10**(7): p. 464-9.



17. Congreve, M., D. Aharony, J. Albert, O. Callaghan, J. Campbell, R.A. Carr, G. Chessari, S. Cowan, P.D. Edwards, M. Frederickson, R. McMenamin, C.W. Murray, S. Patel, and N. Wallis, *Application of fragment screening by X-ray crystallography to the discovery of aminopyridines as inhibitors of beta-secretase*. J Med Chem, 2007. **50**(6): p. 1124-32.
18. de Kloe, G.E., D. Bailey, R. Leurs, and I.J. de Esch, *Transforming fragments into candidates: small becomes big in medicinal chemistry*. Drug Discov Today, 2009. **14**(13-14): p. 630-46.
19. Erlanson, D.A., *Fragment-based lead discovery: a chemical update*. Curr Opin Biotechnol, 2006. **17**(6): p. 643-52.
20. Erlanson, D.A., R.S. McDowell, and T. O'Brien, *Fragment-based drug discovery*. J Med Chem, 2004. **47**(14): p. 3463-82.
21. Chessari, G. and A.J. Woodhead, *From fragment to clinical candidate--a historical perspective*. Drug Discov Today, 2009. **14**(13-14): p. 668-75.
22. Leach, A.R., M.M. Hann, J.N. Burrows, and E.J. Griffen, *Fragment screening: an introduction*. Mol Biosyst, 2006. **2**(9): p. 430-46.
23. Jhoti, H., *Fragment-based drug discovery using rational design*. Ernst Schering Found Symp Proc, 2007(3): p. 169-85.
24. Rees, D.C., M. Congreve, C.W. Murray, and R. Carr, *Fragment-based lead discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(8): p. 660-72.
25. Hajduk, P.J., *Puzzling through fragment-based drug design*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(12): p. 658-9.
26. Frederickson, M., O. Callaghan, G. Chessari, M. Congreve, S.R. Cowan, J.E. Matthews, R. McMenamin, D.M. Smith, M. Vinkovic, and N.G. Wallis, *Fragment-based discovery of mexiletine derivatives as orally bioavailable inhibitors of urokinase-type plasminogen activator*. J Med Chem, 2008. **51**(2): p. 183-6.
27. Caldwell, J.J., T.G. Davies, A. Donald, T. McHardy, M.G. Rowlands, G.W. Aherne, L.K. Hunter, K. Taylor, R. Ruddle, F.I. Raynaud, M. Verdonk, P. Workman, M.D. Garrett, and I. Collins, *Identification of 4-(4-aminopiperidin-1-yl)-7H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidines as selective inhibitors of protein kinase B through fragment elaboration*. J Med Chem, 2008. **51**(7): p. 2147-57.
28. Nordstrom, H., T. Gossas, M. Hamalainen, P. Kallblad, S. Nystrom, H. Wallberg, and U.H. Danielson, *Identification of MMP-12 inhibitors by using biosensor-based screening of a fragment library*. J Med Chem, 2008. **51**(12): p. 3449-59.
29. Tsai, J., J.T. Lee, W. Wang, J. Zhang, H. Cho, S. Mamo, R. Bremer, S. Gillette, J. Kong, N.K. Haass, K. Sproesser, L. Li, K.S. Smalley, D. Fong, Y.L. Zhu, A. Marimuthu, H. Nguyen, B. Lam, J. Liu, I. Cheung, J. Rice, Y. Suzuki, C. Luu, C. Settachatgul, R. Shellooe, J. Cantwell, S.H. Kim, J. Schlessinger, K.Y. Zhang, B.L. West, B. Powell, G. Habets, C. Zhang, P.N. Ibrahim, P. Hirth, D.R. Artis, M. Herlyn, and G. Bollag, *Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008. **105**(8): p. 3041-6.
30. Liu, G., B.G. Szczepankiewicz, Z. Pei, D.A. Janowick, Z. Xin, P.J. Hajduk, C. Abad-Zapatero, H. Liang, C.W. Hutchins, S.W. Fesik, S.J. Ballaron, M.A. Stashko, T. Lubben, A.K. Mika, B.A. Zinker, J.M. Trevillyan, and M.R. Jirousek, *Discovery and structure-activity relationship of oxalylarylaminobenzoic acids as inhibitors of protein tyrosine phosphatase 1B*. J Med Chem, 2003. **46**(11): p. 2093-103.

31. Liu, G., Z. Xin, H. Liang, C. Abad-Zapatero, P.J. Hajduk, D.A. Janowick, B.G. Szczepankiewicz, Z. Pei, C.W. Hutchins, S.J. Ballaron, M.A. Stashko, T.H. Lubben, C.E. Berg, C.M. Rondinone, J.M. Trevillyan, and M.R. Jirousek, *Selective protein tyrosine phosphatase 1B inhibitors: targeting the second phosphotyrosine binding site with non-carboxylic acid-containing ligands*. J Med Chem, 2003. **46**(16): p. 3437-40.
32. Edwards, P.D., J.S. Albert, M. Sylvester, D. Aharony, D. Andisik, O. Callaghan, J.B. Campbell, R.A. Carr, G. Chessari, M. Congreve, M. Frederickson, R.H. Folmer, S. Geschwindner, G. Koether, K. Kolmodin, J. Krumrine, R.C. Mauger, C.W. Murray, L.L. Olsson, S. Patel, N. Spear, and G. Tian, *Application of fragment-based lead generation to the discovery of novel, cyclic amidine beta-secretase inhibitors with nanomolar potency, cellular activity, and high ligand efficiency*. J Med Chem, 2007. **50**(24): p. 5912-25.
33. Wang, Y.S., C. Strickland, J.H. Voigt, M.E. Kennedy, B.M. Beyer, M.M. Senior, E.M. Smith, T.L. Nechuta, V.S. Madison, M. Czarniecki, B.A. McKittrick, A.W. Stamford, E.M. Parker, J.C. Hunter, W.J. Greenlee, and D.F. Wyss, *Application of fragment-based NMR screening, X-ray crystallography, structure-based design, and focused chemical library design to identify novel microM leads for the development of nM BACE-1 (beta-site APP cleaving enzyme 1) inhibitors*. J Med Chem, 2010. **53**(3): p. 942-50.
34. Woodhead, A.J., H. Angove, M.G. Carr, G. Chessari, M. Congreve, J.E. Coyle, J. Cosme, B. Graham, P.J. Day, R. Downham, L. Fazal, R. Feltell, E. Figueroa, M. Frederickson, J. Lewis, R. McMenamin, C.W. Murray, M.A. O'Brien, L. Parra, S. Patel, T. Phillips, D.C. Rees, S. Rich, D.M. Smith, G. Trewartha, M. Vinkovic, B. Williams, and A.J. Woolford, *Discovery of (2,4-dihydroxy-5-isopropylphenyl)-[5-(4-methylpiperazin-1-ylmethyl)-1,3-di hydroisoindol-2-yl]methanone (AT13387), a novel inhibitor of the molecular chaperone Hsp90 by fragment based drug design*. J Med Chem, 2010. **53**(16): p. 5956-69.
35. Huth, J.R., C. Park, A.M. Petros, A.R. Kunzer, M.D. Wendt, X. Wang, C.L. Lynch, J.C. Mack, K.M. Swift, R.A. Judge, J. Chen, P.L. Richardson, S. Jin, S.K. Tahir, E.D. Matayoshi, S.A. Dorwin, U.S. Lador, J.M. Severin, K.A. Walter, D.M. Bartley, S.W. Fesik, S.W. Elmore, and P.J. Hajduk, *Discovery and design of novel HSP90 inhibitors using multiple fragment-based design strategies*. Chem Biol Drug Des, 2007. **70**(1): p. 1-12.
36. Oblak, M., S.G. Grdadolnik, M. Kotnik, R. Jerala, M. Filipic, and T. Solmajer, *In silico fragment-based discovery of indolin-2-one analogues as potent DNA gyrase inhibitors*. Bioorg Med Chem Lett, 2005. **15**(23): p. 5207-10.
37. Lubbers, T., P. Angehrn, H. Gmunder, and S. Herzig, *Design, synthesis, and structure-activity relationship studies of new phenolic DNA gyrase inhibitors*. Bioorg Med Chem Lett, 2007. **17**(16): p. 4708-14.
38. *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.3*. Schrödinger LLC.
39. Erskine, P.T., L. Coates, S. Mall, R.S. Gill, S.P. Wood, D.A. Myles, and J.B. Cooper, *Atomic resolution analysis of the catalytic site of an aspartic proteinase and an unexpected mode of binding by short peptides*. Protein Sci, 2003. **12**(8): p. 1741-9.
40. Clemente, J.C., L.R. Stow, L.K. Janka, J.A. Jeung, K.A. Desai, L. Govindasamy, M. Agbandje-McKenna, R. McKenna, M.M. Goodenow, and B.M. Dunn, *Structure*

- of HIV-1 protease mutant bound to Ritonavir* PDB ID: 2B60, DOI:10.2210/pdb2b60/pdb.
41. Barakat, A., D.S. DiLoreto, Y. Zhang, C. Smith, K. Baier, W.A. Powell, N. Wheeler, R. Sederoff, and J.E. Carlson, *Comparison of the transcriptomes of American chestnut (Castanea dentata) and Chinese chestnut (Castanea mollissima) in response to the chestnut blight infection*. BMC Plant Biol, 2009. **9**: p. 51.
  42. Kim, S.Y., S. Gunasekaran, and N.F. Olson, *Combined use of chymosin and protease from Cryphonectria parasitica for control of meltability and firmness of cheddar cheese*. J Dairy Sci, 2004. **87**(2): p. 274-83.
  43. Awad, S., Q.Q. Luthi-Peng, and Z. Puhan, *Proteolytic activities of suparen and rennilase on buffalo, cow, and goat whole casein and beta-casein*. J Agric Food Chem, 1999. **47**(9): p. 3632-9.
  44. Coates, L., P.T. Erskine, S. Mall, P.A. Williams, R.S. Gill, S.P. Wood, and J.B. Cooper, *The structure of endothiapepsin complexed with the gem-diol inhibitor PD-135,040 at 1.37 Å*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003. **59**(Pt 6): p. 978-81.
  45. Coates, L., P.T. Erskine, S. Mall, R. Gill, S.P. Wood, D.A. Myles, and J.B. Cooper, *X-ray, neutron and NMR studies of the catalytic mechanism of aspartic proteinases*. Eur Biophys J, 2006. **35**(7): p. 559-66.
  46. Coates, L., P.T. Erskine, S.P. Wood, D.A. Myles, and J.B. Cooper, *A neutron Laue diffraction study of endothiapepsin: implications for the aspartic proteinase mechanism*. Biochemistry, 2001. **40**(44): p. 13149-57.
  47. Coates, L., H.F. Tuan, S. Tomanicek, A. Kovalevsky, M. Mustyakimov, P. Erskine, and J. Cooper, *The catalytic mechanism of an aspartic proteinase explored with neutron and X-ray diffraction*. J Am Chem Soc, 2008. **130**(23): p. 7235-7.
  48. Geschwindner, S., L.L. Olsson, J.S. Albert, J. Deinum, P.D. Edwards, T. de Beer, and R.H. Folmer, *Discovery of a novel warhead against beta-secretase through fragment-based lead generation*. J Med Chem, 2007. **50**(24): p. 5903-11.
  49. Cooper, J., W. Quail, C. Frazao, S.I. Foundling, T.L. Blundell, C. Humblet, E.A. Lunney, W.T. Lowther, and B.M. Dunn, *X-ray crystallographic analysis of inhibition of endothiapepsin by cyclohexyl renin inhibitors*. Biochemistry, 1992. **31**(35): p. 8142-50.
  50. Gropp, K., L. Schild, S. Schindler, B. Hube, P.F. Zipfel, and C. Skerka, *The yeast Candida albicans evades human complement attack by secretion of aspartic proteases*. Mol Immunol, 2009. **47**(2-3): p. 465-75.
  51. Lian, C.H. and W.D. Liu, *Differential expression of Candida albicans secreted aspartyl proteinase in human vulvovaginal candidiasis*. Mycoses, 2007. **50**(5): p. 383-90.
  52. Schaller, M., C. Borelli, H.C. Korting, and B. Hube, *Hydrolytic enzymes as virulence factors of Candida albicans*. Mycoses, 2005. **48**(6): p. 365-77.
  53. Hube, B., *Possible role of secreted proteinases in Candida albicans infections*. Rev Iberoam Micol, 1998. **15**(2): p. 65-8.
  54. Naglik, J.R., S.J. Challacombe, and B. Hube, *Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis*. Microbiol Mol Biol Rev, 2003. **67**(3): p. 400-28, table of contents.
  55. Lermann, U. and J. Morschhauser, *Secreted aspartic proteases are not required for invasion of reconstituted human epithelia by Candida albicans*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 11): p. 3281-95.

56. Tuteja, R., *Malaria - an overview*. FEBS J, 2007. **274**(18): p. 4670-9.
57. Bailly, E., R. Jambou, J. Savel, and G. Jaureguiberry, *Plasmodium falciparum: differential sensitivity in vitro to E-64 (cysteine protease inhibitor) and Pepstatin A (aspartyl protease inhibitor)*. J Protozool, 1992. **39**(5): p. 593-9.
58. Francis, S.E., I.Y. Gluzman, A. Oksman, A. Knickerbocker, R. Mueller, M.L. Bryant, D.R. Sherman, D.G. Russell, and D.E. Goldberg, *Molecular characterization and inhibition of a Plasmodium falciparum aspartic hemoglobinase*. EMBO J, 1994. **13**(2): p. 306-17.
59. Boss, C., S. Richard-Bildstein, T. Weller, W. Fischli, S. Meyer, and C. Binkert, *Inhibitors of the Plasmodium falciparum parasite aspartic protease plasmepsin II as potential antimalarial agents*. Curr Med Chem, 2003. **10**(11): p. 883-907.
60. Bhaumik, P., H. Xiao, C.L. Parr, Y. Kiso, A. Gustchina, R.Y. Yada, and A. Wlodawer, *Crystal structures of the histo-aspartic protease (HAP) from Plasmodium falciparum*. J Mol Biol, 2009. **388**(3): p. 520-40.
61. Evin, G., A. Barakat, and C.L. Masters, *BACE: Therapeutic target and potential biomarker for Alzheimer's disease*. Int J Biochem Cell Biol, 2010. **42**(12): p. 1923-6.
62. Ghosh, A.K., N. Kumaragurubaran, L. Hong, G. Koelsh, and J. Tang, *Memapsin 2 (beta-secretase) inhibitors: drug development*. Curr Alzheimer Res, 2008. **5**(2): p. 121-31.
63. Davies, D.R., *The structure and function of the aspartic proteinases*. Annu Rev Biophys Chem, 1990. **19**: p. 189-215.
64. Veerapandian, B., J.B. Cooper, A. Sali, T.L. Blundell, R.L. Rosati, B.W. Dominy, D.B. Damon, and D.J. Hoover, *Direct observation by X-ray analysis of the tetrahedral "intermediate" of aspartic proteinases*. Protein Sci, 1992. **1**(3): p. 322-8.
65. Dunn, B.M., *Structure and mechanism of the pepsin-like family of aspartic peptidases*. Chem Rev, 2002. **102**(12): p. 4431-58.
66. Ido, E., H.P. Han, F.J. Kezdy, and J. Tang, *Kinetic studies of human immunodeficiency virus type 1 protease and its active-site hydrogen bond mutant A28S*. J Biol Chem, 1991. **266**(36): p. 24359-66.
67. Boss, C., O. Corminboeuf, C. Grisostomi, S. Meyer, A.F. Jones, L. Prade, C. Binkert, W. Fischli, T. Weller, and D. Bur, *Achiral, cheap, and potent inhibitors of Plasmepsins I, II, and IV*. ChemMedChem, 2006. **1**(12): p. 1341-5.
68. Prade, L., A.F. Jones, C. Boss, S. Richard-Bildstein, S. Meyer, C. Binkert, and D. Bur, *X-ray structure of plasmepsin II complexed with a potent achiral inhibitor*. J Biol Chem, 2005. **280**(25): p. 23837-43.
69. Patel, S., L. Vuillard, A. Cleasby, C.W. Murray, and J. Yon, *Apo and inhibitor complex structures of BACE (beta-secretase)*. J Mol Biol, 2004. **343**(2): p. 407-16.
70. Hong, L. and J. Tang, *Flap position of free memapsin 2 (beta-secretase), a model for flap opening in aspartic protease catalysis*. Biochemistry, 2004. **43**(16): p. 4689-95.
71. Silva, A.M., A.Y. Lee, S.V. Gulnik, P. Maier, J. Collins, T.N. Bhat, P.J. Collins, R.E. Cachau, K.E. Luker, I.Y. Gluzman, S.E. Francis, A. Oksman, D.E. Goldberg, and J.W. Erickson, *Structure and inhibition of plasmepsin II, a hemoglobin-degrading enzyme from Plasmodium falciparum*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(19): p. 10034-9.

72. Guller, R., A. Binggeli, V. Breu, D. Bur, W. Fischli, G. Hirth, C. Jenny, M. Kansy, F. Montavon, M. Muller, C. Oefner, H. Stadler, E. Vieira, M. Wilhelm, W. Wostl, and H.P. Marki, *Piperidine-renin inhibitors compounds with improved physicochemical properties*. Bioorg Med Chem Lett, 1999. **9**(10): p. 1403-8.
73. Oefner, C., A. Binggeli, V. Breu, D. Bur, J.P. Clozel, A. D'Arcy, A. Dorn, W. Fischli, F. Gruninger, R. Guller, G. Hirth, H. Marki, S. Mathews, M.I. M, R.G. Ridley, H. Stadler, E. Vieira, M. Wilhelm, F. Winkler, and W. Wostl, *Renin inhibition by substituted piperidines: a novel paradigm for the inhibition of monomeric aspartic proteinases?* Chem Biol, 1999. **6**(3): p. 127-31.
74. Vieira, E., A. Binggeli, V. Breu, D. Bur, W. Fischli, R. Guller, G. Hirth, H.P. Marki, M. Muller, C. Oefner, M. Scalone, H. Stadler, M. Wilhelm, and W. Wostl, *Substituted piperidines--highly potent renin inhibitors due to induced fit adaptation of the active site*. Bioorg Med Chem Lett, 1999. **9**(10): p. 1397-402.
75. Corminboeuf, O., O. Bezencon, C. Grisostomi, L. Remen, S. Richard-Bildstein, D. Bur, L. Prade, P. Hess, P. Strickner, W. Fischli, B. Steiner, and A. Treiber, *Design and optimization of new piperidines as renin inhibitors*. Bioorg Med Chem Lett, 2010. **20**(21): p. 6286-90.
76. Ghosh, A.K., *Aspartic Acid Proteases as Therapeutic Targets*, in Vol. 45, *Methods and Principles in Medicinal Chemistry*, R. Mannhold, H. Kubinyi, and G. Folkers, Editors. 2010, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim.
77. Asojo, O.A., S.V. Gulnik, E. Afonina, B. Yu, J.A. Ellman, T.S. Haque, and A.M. Silva, *Novel uncomplexed and complexed structures of plasmepsin II, an aspartic protease from Plasmodium falciparum*. J Mol Biol, 2003. **327**(1): p. 173-81.
78. Rahuel, J., J.P. Priestle, and M.G. Grutter, *The crystal structures of recombinant glycosylated human renin alone and in complex with a transition state analog inhibitor*. J Struct Biol, 1991. **107**(3): p. 227-36.
79. Pearl, L. and T. Blundell, *The active site of aspartic proteinases*. FEBS Lett, 1984. **174**(1): p. 96-101.
80. Malamas, M.S., K. Barnes, M. Johnson, Y. Hui, P. Zhou, J. Turner, Y. Hu, E. Wagner, K. Fan, R. Chopra, A. Olland, J. Bard, M. Pangalos, P. Reinhart, and A.J. Robichaud, *Di-substituted pyridinyl aminohydantoins as potent and highly selective human beta-secretase (BACE1) inhibitors*. Bioorg Med Chem, 2010. **18**(2): p. 630-9.
81. Murray, C.W., O. Callaghan, G. Chessari, A. Cleasby, M. Congreve, M. Frederickson, M.J. Hartshorn, R. McMenamin, S. Patel, and N. Wallis, *Application of fragment screening by X-ray crystallography to beta-secretase*. J Med Chem, 2007. **50**(6): p. 1116-23.
82. Malamas, M.S., J. Erdei, I. Gunawan, J. Turner, Y. Hu, E. Wagner, K. Fan, R. Chopra, A. Olland, J. Bard, S. Jacobsen, R.L. Magolda, M. Pangalos, and A.J. Robichaud, *Design and synthesis of 5,5'-disubstituted aminohydantoins as potent and selective human beta-secretase (BACE1) inhibitors*. J Med Chem, 2010. **53**(3): p. 1146-58.
83. Rahuel, J., V. Rasetti, J. Maibaum, H. Rueger, R. Goschke, N.C. Cohen, S. Stutz, F. Cumin, W. Fuhrer, J.M. Wood, and M.G. Grutter, *Structure-based drug design: the discovery of novel nonpeptide orally active inhibitors of human renin*. Chem Biol, 2000. **7**(7): p. 493-504.

84. Rarey, M. and J.S. Dixon, *Feature trees: a new molecular similarity measure based on tree matching*. J Comput Aided Mol Des, 1998. **12**(5): p. 471-90.
85. Rarey, M., B. Kramer, T. Lengauer, and G. Klebe, *A fast flexible docking method using an incremental construction algorithm*. J Mol Biol, 1996. **261**(3): p. 470-89.
86. Luksch, T., *Structure based inhibitor design for the antimalarial target plasmepsin*. Marburg, Univ., Diss., 2008.
87. Pearson, W.R. and D.J. Lipman, *Improved tools for biological sequence comparison*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1988. **85**(8): p. 2444-8.
88. Bartholomäus, R., *Synthese und Struktur-Wirkungsbeziehungen substituierter Thiophene als neuartige Leitstrukturen zur Inhibition von Plasmepsin II und IV*. Marburg, Univ., Diplomarbeit, 2007.
89. Immormino, R.M. and D.T. Gewirth, *N-Domain Of Grp94 In Complex With the Novel Ligand N-aminoethyl Carboxyamido Adenosine*. PDB-ID: 2HCH, DOI:10.2210/pdb2hch/pdb.
90. Hanzelmann, P., J. Stinglele, K. Hofmann, H. Schindelin, and S. Raasi, *The yeast E4 ubiquitin ligase Ufd2 interacts with the ubiquitin-like domains of Rad23 and Dsk2 via a novel and distinct ubiquitin-like binding domain*. J Biol Chem, 2010. **285**(26): p. 20390-8.
91. Genomics, J.C.f.S., *Crystal structure of a Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase (BDI\_3922) from Parabacteroides distasonis ATCC 8503 at 1.55 Å resolution*. PDB-ID: 3MZZ, DOI:10.2210/pdb3mz2/pdb
92. Koster, H., T. Craan, S. Brass, C. Herhaus, M. Zentgraf, L. Neumann, A. Heine, and G. Klebe, *A small nonrule of 3 compatible fragment library provides high hit rate of endothiapepsin crystal structures with various fragment chemotypes*. J Med Chem, 2011. **54**(22): p. 7784-96.
93. Coates, L., P.T. Erskine, M.P. Crump, S.P. Wood, and J.B. Cooper, *Five atomic resolution structures of endothiapepsin inhibitor complexes: implications for the aspartic proteinase mechanism*. J Mol Biol, 2002. **318**(5): p. 1405-15.
94. Luksch, T., A. Blum, N. Klee, W.E. Diederich, C.A. Sotriffer, and G. Klebe, *Pyrrolidine derivatives as plasmepsin inhibitors: binding mode analysis assisted by molecular dynamics simulations of a highly flexible protein*. ChemMedChem, 2010. **5**(3): p. 443-54.
95. Blum, A., J. Bottcher, A. Heine, G. Klebe, and W.E. Diederich, *Structure-guided design of C2-symmetric HIV-1 protease inhibitors based on a pyrrolidine scaffold*. J Med Chem, 2008. **51**(7): p. 2078-87.
96. Buchold, C., Y. Hemberger, C. Heindl, A. Welker, B. Degel, T. Pfeuffer, P. Staib, S. Schneider, P.J. Rosenthal, J. Gut, J. Morschhauser, G. Bringmann, and T. Schirmeister, *New cis-configured aziridine-2-carboxylates as aspartic acid protease inhibitors*. ChemMedChem, 2011. **6**(1): p. 141-52.
97. Degel, B., P. Staib, S. Rohrer, J. Scheiber, E. Martina, C. Buchold, K. Baumann, J. Morschhauser, and T. Schirmeister, *Cis-Configured aziridines are new pseudo-irreversible dual-mode inhibitors of Candida albicans secreted aspartic protease 2*. ChemMedChem, 2008. **3**(2): p. 302-15.
98. Luksch, T., N.S. Chan, S. Brass, C.A. Sotriffer, G. Klebe, and W.E. Diederich, *Computer-aided design and synthesis of nonpeptidic plasmepsin II and IV inhibitors*. ChemMedChem, 2008. **3**(9): p. 1323-36.

99. Koch, C., A. Heine, and G. Klebe, *Radiation damage reveals promising interaction position*. J Synchrotron Radiat, 2011. **18**(Pt 5): p. 782-9.
100. Adams, P.D., P.V. Afonine, G. Bunkoczi, V.B. Chen, I.W. Davis, N. Echols, J.J. Headd, L.W. Hung, G.J. Kapral, R.W. Grosse-Kunstleve, A.J. McCoy, N.W. Moriarty, R. Oeffner, R.J. Read, D.C. Richardson, J.S. Richardson, T.C. Terwilliger, and P.H. Zwart, *PHENIX: a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2010. **66**(Pt 2): p. 213-21.
101. Emsley, P. and K. Cowtan, *Coot: model-building tools for molecular graphics*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 12 Pt 1): p. 2126-32.
102. Sadowski, J., J. Gasteiger, and G. Klebe, J. Chem. Inf. Comput, 1994. **34**: p. 1000-1008.
103. Pedrosa, R., C. Andrés, A. Gutiérrez-Loriente, and J. Nieto, *Sequential Diastereoselective Addition of Allylic and Homoallylic Grignard Reagents to 2-Acyl-perhydro-1,3-benzoxazines and Ring-Closing Metathesis: an Asymmetric Route to Azepin-3-ol and Azocin-3-ol Derivatives*. Eur. J. Org. Chem, 2005. **12**: p. 2449–2458.
104. Allen, F.H., *The Cambridge Structural Database: a quarter of a million crystal structures and rising*. Acta Crystallogr. Sect. B: Struct. Sci 2002. **58**: p. 380–388.
105. Bottcher, J., A. Blum, S. Dorr, A. Heine, W.E. Diederich, and G. Klebe, *Targeting the open-flap conformation of HIV-1 protease with pyrrolidine-based inhibitors*. ChemMedChem, 2008. **3**(9): p. 1337-44.
106. Bottcher, J., A. Blum, A. Heine, W.E. Diederich, and G. Klebe, *Structural and kinetic analysis of pyrrolidine-based inhibitors of the drug-resistant Ile84Val mutant of HIV-1 protease*. J Mol Biol, 2008. **383**(2): p. 347-57.
107. Czodrowski, P., C.A. Sotriffer, and G. Klebe, *Atypical protonation states in the active site of HIV-1 protease: a computational study*. J Chem Inf Model, 2007. **47**(4): p. 1590-8.
108. Hyland, L.J., T.A. Tomaszek, Jr., and T.D. Meek, *Human immunodeficiency virus-1 protease. 2. Use of pH rate studies and solvent kinetic isotope effects to elucidate details of chemical mechanism*. Biochemistry, 1991. **30**(34): p. 8454-63.
109. Behnen, J., H. Koster, G. Neudert, T. Craan, A. Heine, and G. Klebe, *Experimental and computational active site mapping as a starting point to fragment-based lead discovery*. ChemMedChem, 2012. **7**(2): p. 248-61.
110. Fukada, H. and K. Takahashi, *Enthalpy and heat capacity changes for the proton dissociation of various buffer components in 0.1 M potassium chloride*. Proteins, 1998. **33**(2): p. 159-66.
111. Goldberg, R.N., N. Kishore, and R.M. Lennen, *Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers*. J. Phys. Chem. Ref. Data, 2002. **31**(2): p. 231 - 360.
112. Backman, D., M. Monod, and U.H. Danielson, *Biosensor-based screening and characterization of HIV-1 inhibitor interactions with Sap 1, Sap 2, and Sap 3 from Candida albicans*. J Biomol Screen, 2006. **11**(2): p. 165-75.
113. Blanco, M.T., C. Hurtado, C. Perez-Giraldo, F.J. Moran, C. Gonzalez-Velasco, and A.C. Gomez-Garcia, *Effect of ritonavir and saquinavir on Candida albicans growth rate and in vitro activity of aspartyl proteinases*. Med Mycol, 2003. **41**(2): p. 167-70.

114. Staib, P., U. Lermann, J. Blass-Warmuth, B. Degel, R. Wurzner, M. Monod, T. Schirmeister, and J. Morschhauser, *Tetracycline-inducible expression of individual secreted aspartic proteases in Candida albicans allows isoenzyme-specific inhibitor screening*. Antimicrob Agents Chemother, 2008. **52**(1): p. 146-56.
115. Cassone, A., F. De Bernardis, A. Torosantucci, E. Tacconelli, M. Tumbarello, and R. Cauda, *In vitro and in vivo anticandidal activity of human immunodeficiency virus protease inhibitors*. J Infect Dis, 1999. **180**(2): p. 448-53.
116. Korting, H.C., M. Schaller, G. Eder, G. Hamm, U. Bohmer, and B. Hube, *Effects of the human immunodeficiency virus (HIV) proteinase inhibitors saquinavir and indinavir on in vitro activities of secreted aspartyl proteinases of Candida albicans isolates from HIV-infected patients*. Antimicrob Agents Chemother, 1999. **43**(8): p. 2038-42.
117. Skinner-Adams, T.S., J.S. McCarthy, D.L. Gardiner, P.M. Hilton, and K.T. Andrews, *Antiretrovirals as antimalarial agents*. J Infect Dis, 2004. **190**(11): p. 1998-2000.
118. Duval, X., G. Peytavin, B. Fouqueray, C. Leport, and J.L. Vilde, *Renin-angiotensin system inhibition in a patient having an overdose of HIV protease inhibitor*. AIDS, 1999. **13**(14): p. 1983-4.
119. Abad-Zapatero, C., R. Goldman, S.W. Muchmore, C. Hutchins, K. Stewart, J. Navaza, C.D. Payne, and T.L. Ray, *Structure of a secreted aspartic protease from C. albicans complexed with a potent inhibitor: implications for the design of antifungal agents*. Protein Sci, 1996. **5**(4): p. 640-52.
120. Cutfield, S.M., E.J. Dodson, B.F. Anderson, P.C. Moody, C.J. Marshall, P.A. Sullivan, and J.F. Cutfield, *The crystal structure of a major secreted aspartic proteinase from Candida albicans in complexes with two inhibitors*. Structure, 1995. **3**(11): p. 1261-71.
121. Tie, Y., A.Y. Kovalevsky, P. Boross, Y.F. Wang, A.K. Ghosh, J. Tozser, R.W. Harrison, and I.T. Weber, *Atomic resolution crystal structures of HIV-1 protease and mutants V82A and I84V with saquinavir*. Proteins, 2007. **67**(1): p. 232-42.
122. Kempf, D.J., K.C. Marsh, J.F. Denissen, E. McDonald, S. Vasavanonda, C.A. Flentge, B.E. Green, L. Fino, C.H. Park, X.P. Kong, and et al., *ABT-538 is a potent inhibitor of human immunodeficiency virus protease and has high oral bioavailability in humans*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(7): p. 2484-8.
123. Fitzgerald, P.M., B.M. McKeever, J.F. VanMiddlesworth, J.P. Springer, J.C. Heimbach, C.T. Leu, W.K. Herber, R.A. Dixon, and P.L. Darke, *Crystallographic analysis of a complex between human immunodeficiency virus type 1 protease and acetyl-pepstatin at 2.0-A resolution*. J Biol Chem, 1990. **265**(24): p. 14209-19.
124. Fareed, J., D. Callas, D.A. Hoppensteadt, B.E. Lewis, R.L. Bick, and J.M. Walenga, *Antithrombin agents as anticoagulants and antithrombotics: implications in drug development*. Semin Hematol, 1999. **36**(1 Suppl 1): p. 42-56.
125. McKay, P.B., M.B. Peters, G. Carta, C.T. Flood, E. Dempsey, A. Bell, C. Berry, D.G. Lloyd, and D. Fayne, *Identification of plasmepsin inhibitors as selective anti-malarial agents using ligand based drug design*. Bioorg Med Chem Lett, 2011. **21**(11): p. 3335-41.
126. Baurin, N., F. Aboul-Ela, X. Barril, B. Davis, M. Drysdale, B. Dymock, H. Finch, C. Fromont, C. Richardson, H. Simmonite, and R.E. Hubbard, *Design and*



- characterization of libraries of molecular fragments for use in NMR screening against protein targets.* J Chem Inf Comput Sci, 2004. **44**(6): p. 2157-66.
127. *Molecular Operating Environment (MOE)*, version 2008.11, Chemical Computing Group Inc.; Montreal, Canada.
128. Kramer, C., B. Beck, and T. Clark, *Insolubility classification with accurate prediction probabilities using a MetaClassifier.* J Chem Inf Model, 2010. **50**(3): p. 404-14.
129. Kramer, C., T. Heinisch, T. Fligge, B. Beck, and T. Clark, *A consistent dataset of kinetic solubilities for early-phase drug discovery.* ChemMedChem, 2009. **4**(9): p. 1529-36.
130. Stachel, S.J., C.A. Coburn, D. Rush, K.L. Jones, H. Zhu, H. Rajapakse, S.L. Graham, A. Simon, M. Katharine Holloway, T.J. Allison, S.K. Munshi, A.S. Espeseth, P. Zuck, D. Colussi, A. Wolfe, B.L. Pietrak, M.T. Lai, and J.P. Vacca, *Discovery of aminoheterocycles as a novel beta-secretase inhibitor class: pH dependence on binding activity part 1.* Bioorg Med Chem Lett, 2009. **19**(11): p. 2977-80.
131. Matter, H., M. Nazare, S. Gussregen, D.W. Will, H. Schreuder, A. Bauer, M. Urmann, K. Ritter, M. Wagner, and V. Wehner, *Evidence for C-Cl/C-Br...pi interactions as an important contribution to protein-ligand binding affinity.* Angew Chem Int Ed Engl, 2009. **48**(16): p. 2911-6.
132. Connolly, M.L., *The molecular surface package.* J Mol Graph, 1993. **11**(2): p. 139-41.
133. Manning, G., D.B. Whyte, R. Martinez, T. Hunter, and S. Sudarsanam, *The protein kinase complement of the human genome.* Science, 2002. **298**(5600): p. 1912-34.
134. Taylor, S.S., C. Kim, C.Y. Cheng, S.H. Brown, J. Wu, and N. Kannan, *Signaling through cAMP and cAMP-dependent protein kinase: diverse strategies for drug design.* Biochim Biophys Acta, 2008. **1784**(1): p. 16-26.
135. Rider, M.H., L. Bertrand, D. Vertommen, P.A. Michels, G.G. Rousseau, and L. Hue, *6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis.* Biochem J, 2004. **381**(Pt 3): p. 561-79.
136. Beierwaltes, W.H., *The role of calcium in the regulation of renin secretion.* Am J Physiol Renal Physiol, 2010. **298**(1): p. F1-F11.
137. Carmen, G.Y. and S.M. Victor, *Signalling mechanisms regulating lipolysis.* Cell Signal, 2006. **18**(4): p. 401-8.
138. Michel, J.J. and J.D. Scott, *AKAP mediated signal transduction.* Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2002. **42**: p. 235-57.
139. Deininger, M., E. Buchdunger, and B.J. Druker, *The development of imatinib as a therapeutic agent for chronic myeloid leukemia.* Blood, 2005. **105**(7): p. 2640-53.
140. Kim, C., C.Y. Cheng, S.A. Saldanha, and S.S. Taylor, *PKA-I holoenzyme structure reveals a mechanism for cAMP-dependent activation.* Cell, 2007. **130**(6): p. 1032-43.
141. Newlon, M.G., M. Roy, D. Morikis, D.W. Carr, R. Westphal, J.D. Scott, and P.A. Jennings, *A novel mechanism of PKA anchoring revealed by solution structures of anchoring complexes.* EMBO J, 2001. **20**(7): p. 1651-62.
142. Taylor, S.S., C. Kim, D. Vigil, N.M. Haste, J. Yang, J. Wu, and G.S. Anand, *Dynamics of signaling by PKA.* Biochim Biophys Acta, 2005. **1754**(1-2): p. 25-37.

143. Madhusudan, P. Akamine, N.H. Xuong, and S.S. Taylor, *Crystal structure of a transition state mimic of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase*. Nat Struct Biol, 2002. **9**(4): p. 273-7.
144. Steichen, J.M., G.H. Iyer, S. Li, S.A. Saldanha, M.S. Deal, V.L. Woods, Jr., and S.S. Taylor, *Global consequences of activation loop phosphorylation on protein kinase A*. J Biol Chem, 2010. **285**(6): p. 3825-32.
145. Akamine, P., Madhusudan, J. Wu, N.H. Xuong, L.F. Ten Eyck, and S.S. Taylor, *Dynamic features of cAMP-dependent protein kinase revealed by apoenzyme crystal structure*. J Mol Biol, 2003. **327**(1): p. 159-71.
146. Narayana, N., S. Cox, X. Nguyen-huu, L.F. Ten Eyck, and S.S. Taylor, *A binary complex of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase and adenosine further defines conformational flexibility*. Structure, 1997. **5**(7): p. 921-35.
147. Madhusudan, E.A. Trafny, N.H. Xuong, J.A. Adams, L.F. Ten Eyck, S.S. Taylor, and J.M. Sowadski, *cAMP-dependent protein kinase: crystallographic insights into substrate recognition and phosphotransfer*. Protein Sci, 1994. **3**(2): p. 176-87.
148. Taylor, S.S., J. Yang, J. Wu, N.M. Haste, E. Radzio-Andzelm, and G. Anand, *PKA: a portrait of protein kinase dynamics*. Biochim Biophys Acta, 2004. **1697**(1-2): p. 259-69.
149. Zheng, J., E.A. Trafny, D.R. Knighton, N.H. Xuong, S.S. Taylor, L.F. Ten Eyck, and J.M. Sowadski, *2.2 A refined crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MnATP and a peptide inhibitor*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1993. **49**(Pt 3): p. 362-5.
150. Armstrong, R.N., H. Kondo, and E.T. Kaiser, *Cyclic AMP-dependent ATPase activity of bovine heart protein kinase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1979. **76**(2): p. 722-5.
151. Zheng, J., D.R. Knighton, L.F. ten Eyck, R. Karlsson, N. Xuong, S.S. Taylor, and J.M. Sowadski, *Crystal structure of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase complexed with MgATP and peptide inhibitor*. Biochemistry, 1993. **32**(9): p. 2154-61.
152. Khavrutskii, I.V., B. Grant, S.S. Taylor, and J.A. McCammon, *A transition path ensemble study reveals a linchpin role for Mg(2+) during rate-limiting ADP release from protein kinase A*. Biochemistry, 2009. **48**(48): p. 11532-45.
153. Engh, R.A., A. Girod, V. Kinzel, R. Huber, and D. Bossemeyer, *Crystal structures of catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in complex with isoquinolinesulfonyl protein kinase inhibitors H7, H8, and H89. Structural implications for selectivity*. J Biol Chem, 1996. **271**(42): p. 26157-64.
154. Davies, T.G., M.L. Verdonk, B. Graham, S. Saalau-Bethell, C.C. Hamlett, T. McHardy, I. Collins, M.D. Garrett, P. Workman, S.J. Woodhead, H. Jhoti, and D. Barford, *A structural comparison of inhibitor binding to PKB, PKA and PKA-PKB chimera*. J Mol Biol, 2007. **367**(3): p. 882-94.
155. Akamine, P., Madhusudan, L.L. Brunton, H.D. Ou, J.M. Canaves, N.H. Xuong, and S.S. Taylor, *Balanol analogues probe specificity determinants and the conformational malleability of the cyclic 3',5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase catalytic subunit*. Biochemistry, 2004. **43**(1): p. 85-96.
156. Pflug, A., J. Rogozina, D. Lavogina, E. Enkvist, A. Uri, R.A. Engh, and D. Bossemeyer, *Diversity of bisubstrate binding modes of adenosine analogue-*

- oligoarginine conjugates in protein kinase a and implications for protein substrate interactions.* J Mol Biol, 2010. **403**(1): p. 66-77.
157. Freeman-Cook, K.D., C. Autry, G. Borzillo, D. Gordon, E. Barbacci-Tobin, V. Bernardo, D. Briere, T. Clark, M. Corbett, J. Jakubczak, S. Kakar, E. Knauth, B. Lippa, M.J. Luzzio, M. Mansour, G. Martinelli, M. Marx, K. Nelson, J. Pandit, F. Rajamohan, S. Robinson, C. Subramanyam, L. Wei, M. Wythes, and J. Morris, *Design of selective, ATP-competitive inhibitors of Akt.* J Med Chem, 2010. **53**(12): p. 4615-22.
158. Goodford, P.J., *A computational procedure for determining energetically favorable binding sites on biologically important macromolecules.* J Med Chem, 1985. **28**(7): p. 849-57.
159. Joseph-McCarthy, D., J.M. Hogle, and M. Karplus, *Use of the multiple copy simultaneous search (MCSS) method to design a new class of picornavirus capsid binding drugs.* Proteins, 1997. **29**(1): p. 32-58.
160. Velec, H.F., H. Gohlke, and G. Klebe, *DrugScore(CSD)-knowledge-based scoring function derived from small molecule crystal data with superior recognition rate of near-native ligand poses and better affinity prediction.* J Med Chem, 2005. **48**(20): p. 6296-303.
161. Verdonk, M.L., J.C. Cole, and R. Taylor, *SuperStar: a knowledge-based approach for identifying interaction sites in proteins.* J Mol Biol, 1999. **289**(4): p. 1093-108.
162. Neudert, G. and G. Klebe, *DSX: A Knowledge-Based Scoring Function for the Assessment of Protein-Ligand Complexes.* J Chem Inf Model, 2011.
163. Gerlach, C., M. Munzel, B. Baum, H.D. Gerber, T. Craan, W.E. Diederich, and G. Klebe, *KNOBLE: a knowledge-based approach for the design and synthesis of readily accessible small-molecule chemical probes to test protein binding.* Angew Chem Int Ed Engl, 2007. **46**(47): p. 9105-9.
164. Larson, M.K. and J.R. Whitaker, *Endothia parasitica* Protease. Parameters Affecting Stability of the Rennin-like Enzyme. Journal of Dairy Science, 1970. **53**: p. 262-269.
165. Moews, P.C. and C.W. Bunn, *An x-ray crystallographic study of the rennin-like enzyme of Endothia parasitica.* J Mol Biol, 1970. **54**(2): p. 395-7.
166. Otwinowski, Z. and w. Minor, *Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode.* Methods in Enzymology, 1997. **276**: p. 307-326.
167. Storoni, L.C., A.J. McCoy, and R.J. Read, *Likelihood-enhanced fast rotation functions.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 3): p. 432-8.
168. Brunger, A.T., P.D. Adams, G.M. Clore, W.L. DeLano, P. Gros, R.W. Grosse-Kunstleve, J.S. Jiang, J. Kuszewski, M. Nilges, N.S. Pannu, R.J. Read, L.M. Rice, T. Simonson, and G.L. Warren, *Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 1998. **54**(Pt 5): p. 905-21.
169. Sheldrick, G.M., *A short history of SHELX.* Acta Crystallogr A, 2008. **64**(Pt 1): p. 112-22.
170. Potterton, E., P. Briggs, M. Turkenburg, and E. Dodson, *A graphical user interface to the CCP4 program suite.* Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2003. **59**(Pt 7): p. 1131-7.

171. Schüttelkopf, A.W. and D.M. van Aalten, *PRODRG: a tool for high-throughput crystallography of protein-ligand complexes*. Acta Crystallogr D Biol Crystallogr, 2004. **60**(Pt 8): p. 1355-63.
172. Cheng, Y. and W.H. Prusoff, *Relationship between the inhibition constant ( $K_1$ ) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition ( $I_{50}$ ) of an enzymatic reaction*. Biochem Pharmacol, 1973. **22**(23): p. 3099-108.
173. Toth, M.V. and G.R. Marshall, *A simple, continuous fluorometric assay for HIV protease*. Int J Pept Protein Res, 1990. **36**(6): p. 544-50.

## 9 Anhang

### Liste weiterer im Screen gefundener Kristallisationsbedingung für EP

In den hier aufgeführten Bedingungen wurden in dem in Kapitel 3.2.3 beschriebenen Roboterscreening mit einem NC239-Endothiapepsin Komplex Kristalle erhalten. Die mit einem + markierte Bedingung wurde anschließend zu einer reproduzierbaren Bedingung optimiert. Die mit # markierte Bedingung wurde erfolgreich reproduziert, aber anschließend nicht weiter verfolgt. Die mit o markierte wurde erfolglos versucht zu reproduzieren. Alle anderen wurden nicht weiter verfolgt. Die Bezeichnung der Bedingung gibt den Namen des kommerziellen Screens sowie die Nummer der Bedingung an.

Bezeichnung	Zusammensetzung	
Cryo 43	0.085 M HEPES pH 7.5 3.655 M NaCl 15 % Glycerol	
MBC I 75	0.05 M Tricine pH 8.0 22 % PEG 4000	<b>O</b>
JCSG 50	0.2 M NaCl 0.1 N Na-Cacodylat pH 6.5 2 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	<b>+</b>
MBC II	0.2 M CaCl <sub>2</sub> 0.1 M Na-acetat pH 4.6 30 % Isopropanol 20 % Glycerol	
Anions 9	0.1 M MES pH 6.5 1.2 M tri-Na-citrate	
Anions 3	0.1 M Na-acetat pH 4.6 1.2 M tri-Na-citrate	

Classics 30	0.1 M Tris-HCl pH 8.5 2.0 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	
Classics 7	0.1 M tri-Na-citrate pH 5.6 20 % Isopropanol 20 % PEG 4000 (w/v)	#
Classics 31	2.0 M NH <sub>4</sub> SO <sub>4</sub>	
Classics 95	0.1 M HEPES pH 7.5 20 % PEG 10000 (w/v) 8 % Ethylenglycol	

### Liste der Screening-Ergebnisse für die gesamte Fragmentbibliothek

Die hier angeführte Liste gibt die kompletten Screening-Ergebnisse des in Kapitel 3.6.3 vorgestellten Fragmentscreens für Endothiapepsin wieder. Angegeben ist jeweils die prozentuale Inhibition bei einer Proteinkonzentration von 1 M. Die mit \* markierten Verbindungen wurden lediglich bei 500 µM vermessen. Verbindungen mit einem x weisen keine signifikante Inhibition, d.h. eine Inhibition von 20 % oder weniger auf. Die mit – markierten Verbindungen konnten nicht vermessen werden, wobei die Verbindungen mit einem L aufgrund ihrer Löslichkeit und solche mit einem F aufgrund ihrer Eigenfluoreszenz aussortiert wurden. In Spalte F sind solche Inhibitoren markiert welche eine starke Eigenfluoreszenz hatten aber trotzdem noch vermessen werden konnten. Eine 1 steht dabei für eine mäßige, die 2 für eine starke Eigenfluoreszenz (die 1 steht für eine RU zwischen 10000-20000, die 2 für eine RU > 20000).

ID	% Inh.	F	ID	% Inh.	F	ID	% Inh.	F	ID	% Inh.	F
1	x		101	21		201	51		301	75	
2	28		102	x		202	x		302	x	
3	92		103	x		203	x		303	x	
4	x		104	x		204	x		304	x	2
5	89	1	105	x		205	x		305	x	
6	26		106	x		206	x		306	7	
7	x		107 *	x		207	x		307	x	
8	x		108	- (L)		208	x		308	53	1
9 *	x		109	89		209	x		309	x	
10 *	x		110	x		210	- (L)		310	- (L)	
11 *	x		111	x		211	x		311	21	
12	x		112	x		212	x		312	- (L)	

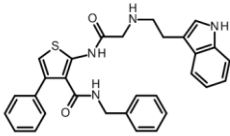
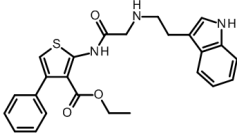
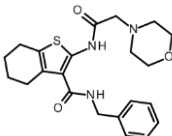
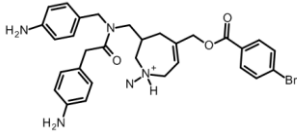
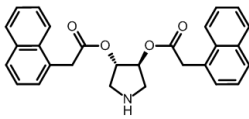
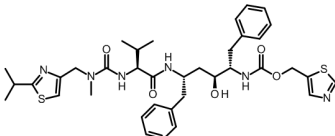
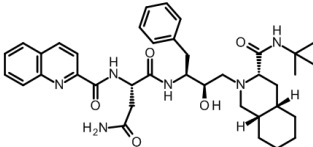
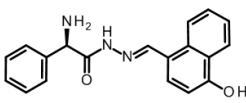
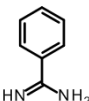
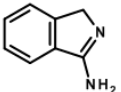
13	x		113	x		213	- (F)		313	x	
14	x		114	24		214	x		314	x	
15	x		115	x		215	x		315 *	x	
16	x		116	x		216	45		316	x	
17	97		117	x		217	x		317	x	
18	x		118	- (F)		218	- (L)		318	- (L)	
19	x		119	x		219	x		319	23	
20	x		120	x		220	x		320	24	
21	x		121	x		221	25		321	x	
22	x		122	26		222	52		322	x	
23	x		123	- (F)		223	x		323	- (F)	
24	33		124	x		224	63		324	x	
25	x		125	- (L)		225	x		325	x	
26	x	2	126	x		226	x		326	- (F)	
27	x		127	x		227	x		327	x	
28	x		128	23		228	x		328	x	
29	x		129 *	x		229	- (L)		329	x	
30	x	1	130	x		230	x		330	x	
31	62		131	x		231 *	- (F)		331	- (F)	
32	x		132	x		232	x		332	x	
33	x		133	28		233	x		333	76	
34	- (L)		134	57		234	- (F)		334	x	
35	x		135	x		235 *	x		335	60	
36 *	x		136	x		236	100		336	x	
37	20		137	47		237	x	2	337	38	
38 *	x		138	x		238	100		338	35	
39	x		139	25		239	x		339	x	
40	x		140	45		240	x		340	x	
41	49		141	46		241	x	2	341	x	
42	99		142	80	2	242	21		342	25	
43	- (L)		143	x		243	x		343	x	
44	x		144	x		244 *	x		344	x	
45	x		145	x		245	x		345	x	
46	x		146	x		246	x	2	346	27	
47 *	x		147	x		247	25		347	x	2
48	x		148	51		248	x	1	348	x	
49	- (F)		149	100		249	x		349	x	
50 *	- (F)		150	x		250	x		350	x	
51	46		151	x		251	36		351	x	
52	x		152	x		252	64		352	x	2
53	39		153	22		253	x		353	- (F)	
54	- (L)		154	x		254	35		354	39	1
55	x	1	155	x		255	84		355	x	
56	x		156	- (L)		256	x		356	- (F)	
57	x		157	x		257	x		357	38	
58	x		158	x		258	x		358	x	

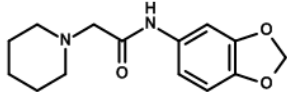
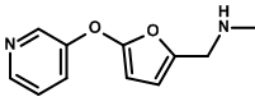
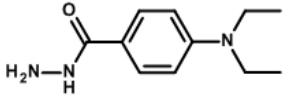
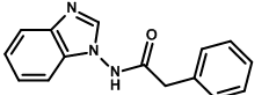
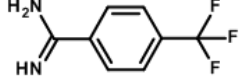
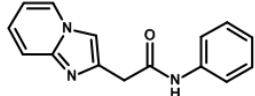
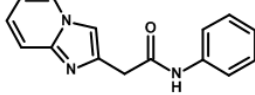
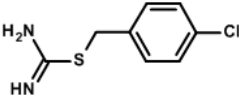
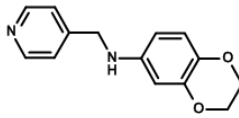
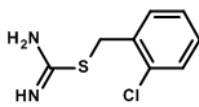
59	x		159	60		259	x		359	-(F)	
60	x		160	x		260	x		360	x	
61	x		161	80		261	47		361		
62	x		162	34		262	29		362	43	
63	66		163	x		263	x		363	x	
64	99		164	-(F)		264	x		364	-(F)	
65	50		165	x		265	-(L)				
66	-(F)		166	x		266	54				
67	x		167	24		267	54				
68	x		168	92		268	x				
69	x		169	x		269	x				
70	x		170	-(F)		270	x				
71	x		171	42		271	-(L)				
72	x		172	21		272	27				
73	30	2	173	27		273	x				
74	25	2	174	x		274	x				
75	-(L)		175	75		275	x				
76	x		176	55	1	276	x				
77	x		177 *	0		277	x				
78	x		178	0	2	278	x				
79	34		179	x		279	x				
80	x		180	x		280	x				
81	38		181	-(L)		281	x				
82	x		182	-(L)		282	39	2			
83	89		183	60		283	28	2			
84 *	x		184	x		284	87				
85 *	x	1	185	21		285	x				
86	x		186	76		286	x				
87	x		187	x		287	x				
88	47		188	47		288	x				
89	x		189	x		289	x				
90	x		190	x		290	84				
91	x		191	x		291	50				
92	x		192 *	55		292	x				
93	79		193	x	1	293	30				
94	x		194	x		294	x				
95	x		195	x		295	44				
96	x		196	x		296	x				
97	-(L)		197	x		297	78	2			
98	x		198	x		298	x				
99	x		199	x		299	x				
100	x		200	x		300 *	x				



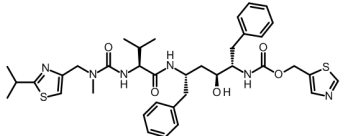
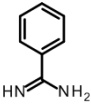
## Liste aller Kristallstrukturen

Kristallstrukturen mit Endothiapepsin:

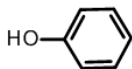
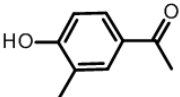
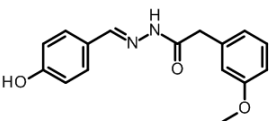
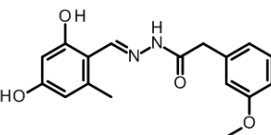
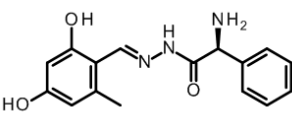
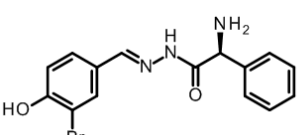
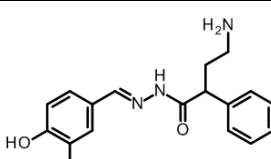
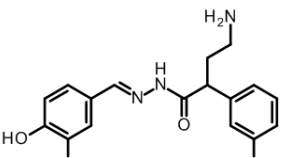
Ligand		PDB-Code	Kapitel
RB91		3PSY	3.1
RB49		3T7Q	3.1
SH40		3T7X	3.1
NC239		3T6I	3.2
ST47		3Q6Y	3.3
Ritonavir		3PRS	3.4
Saquinavir		3PWW	3.4
SB217		3T7P	3.5
Benzamidin		3PCZ	3.5
005		3PBD	3.6

041		3PGI	3.6
063		3PB5	3.6
109		3PBZ	3.6
148		3PMY	3.6
216		3PCW	3.6
255		3PM4	3.6
284		3PMU	3.6
290		3PLD	3.6
291		3PIO	3.6
306		3PLL	3.6

Kristallstrukturen mit SAP2:

Ligand		PDB-Code	Kapitel
Ritonavir		3Q70	3.4
Benzamidin		3PVK	3.5

## Kristallstrukturen mit PKA:

Ligand		PDB-Code	Kapitel
Phenol		3NX8	5.1
2-Methyl-4-Acetylphenol		3OOG	5.1
SB47		3Q70	5.1
SB68		3POO	5.1
SB193		3OXT	5.1
SB215		3OWP	5.1
SB298		3POM	5.1
SB302		--	5.1

## Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht bzw. sind zur Veröffentlichung vorbereitet:

A Small Nonrule of 3 Compatible Fragment Library Provides High Hit Rate of Endothiapepsin Crystal Structures with Various Fragment Chemotypes.

Köster H, Craan T, Brass S, Herhaus C, Zentgraf M, Neumann L, Heine A, Klebe G  
J Med Chem. 2011 Nov 24; 54(22):7784-96

Experimental and computational active site mapping as a starting point to fragment-based lead discovery.

Behnen J, Köster H, Neudert G, Craan T, Heine A, Klebe G.  
ChemMedChem. 2012 Feb 6;7(2):248-61.

From Probe to Fragment and Lead: A Combined Approach of Experimental Fragment Screening and Computational De Novo Design

Köster H., Craan T., Brass S., Hillerz P., Musil G., Heine A., Klebe G.  
Manuskript in Vorbereitung

## Danksagung

Bei *Prof. Gerhard Klebe* möchte ich mich für die interessanten und vielfältigen Aufgabenstellungen bedanken. Besonders danke ich ihm für die großen Freiheiten bei der Bearbeitung der Themen und das mir entgegengebrachte Vertrauen. Auch möchte ich ihm für die Möglichkeit danken, an Konferenzen teilzunehmen auf denen ich wertvolle Ideen für die eigene Arbeit sammeln konnte.

*Dr. Andreas Heine* danke ich für die ausführliche und fundierte Einführung in die Kristallographie. Zudem möchte ich mich herzlich für die gute Betreuung und die vielen ebenso netten wie hilfreichen Diskussionen bedanken. Seine Erfahrung sowie Bereitschaft geduldig schwierige Kristallstrukturen zu begutachten, haben maßgeblich zu der Qualität dieser Arbeit beigetragen.

*Prof. Wibke Diederich* möchte ich für die gute Zusammenarbeit und insbesondere der Unterstützung bei der Etablierung des Endothiapepsinprojekts danken.

Besonderer Dank gilt *Tobias Craan, Sascha Brass, Hans-Dieter Gerber* sowie *Jörg Bomke* von der Merck Serono für die gelungene Zusammenarbeit auf dem PKA-Projekt.

*Tobias Craan, Sascha Brass* sowie unseren industriellen Kooperationspartnern Merck Serono, Boehringer/Ingelheim und Proteros Biostructures danke ich für den Aufbau der Fragmentbibliothek sowie die gute Zusammenarbeit.

*Christian Sohn* danke ich für seine Hilfsbereitschaft sowie die Wartung und Betreuung der Röntgengeräte.

Allen Mitgliedern der Gruppe von Prof. Diederich, insbesondere *Nan-Si Brass, Amir Shahim, Ruben Bartholomäus* und *Andreas Blum* danke ich für die Synthese zahlreicher Inhibitoren.

*Prof. Helena Danielson* und ihrer Gruppe insbesondere *Tony, Angelica, Johan* und *Christian* danke ich für die Möglichkeit SPR Messungen an Endothiapepsin durchzuführen und eine schöne Zeit in Uppsala.

*Lydia Hartleben* danke ich für die professionelle Unterstützung in administrativen und organisatorischen Punkten.

Ich danke allen, die an den Synchrotrons in Berlin, Hamburg und Villigen Datensätze gesammelt haben, sowie dem dortigen Personal für die gute Betreuung der Beamlines.

Allen Administratoren unserer Arbeitsgruppe, insbesondere *Sven, Gerd* und *Michael* danke ich für die Wartung der Rechner und die Hilfsbereitschaft bei computerbezogenen Problemen.

*Ina* danke ich für eine wunderbare Büroatmosphäre.

*Ina, Adam, Inna, Stephan, Barbara* und *Manuel* danke ich für viele anregende Diskussionen, entspannende Kaffeepausen und eine schöne Zeit in Marburg.

Der ganzen AG Klebe und AG Diederich danke ich für eine angenehme Zeit am Institut.

Meinem Mann *Niko* danke ich für die Unterstützung in den letzten Jahren.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion.







## Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Endothiapepsin und Protein Kinase A: Komplexstrukturen mit neuartigen Inhibitoren, Durchmustern einer Fragmentbibliothek sowie Inhibitor-Design ausgehend von einer Sonde“

selbstständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den \_\_\_\_ . \_\_\_\_ . 2012

Helene Köster



# Lebenslauf

## **Persönliche Daten:**

Name: Helene Annemarie Köster, geb. Krüger

Familienstand: verheiratet, ein Kind

Nationalität: deutsch

Geburtsdatum: 21.09.1982

Geburtsort: Kassel

## **Ausbildung und Studium**

Seit 01/2008	Philipps Universität Marburg Promotion am Fachbereich pharmazeutische Chemie in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Klebe
12/2007	Approbation zur Apothekerin
10/2002 - 09/2006	Studium der Pharmazie an der Philipps-Universität Marburg
06/2002	Geschwister-Scholl Gymnasium Winterberg Abschluss: Abitur

## **Praktika**

11/2006 – 05/2007	Birken-Apotheke in Sterzhausen: Pharmaziepraktikum in der öffentlichen Apotheke
05/2007 – 11/2007	STADA Arzneimittel AG: Pharmaziepraktikum im Bereich der Produktion